



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E
ENGENHARIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA
QUÍMICA**

**TOXICIDADE DO ANTIBIÓTICO SULFATO DE
COLISTINA EMPREGADO NA SUINOCULTURA SOBRE
PROCESSOS MICROBIOLÓGICOS RELACIONADOS AO
TRATAMENTO DE EFLUENTES**

CLÉO RODRIGO BRESSAN

**FLORIANÓPOLIS
MAIO/2012**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E
ENGENHARIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA
QUÍMICA**

**TOXICIDADE DO ANTIBIÓTICO SULFATO DE
COLISTINA EMPREGADO NA SUINOCULTURA SOBRE
PROCESSOS MICROBIOLÓGICOS RELACIONADOS AO
TRATAMENTO DE EFLUENTES**

Cléo Rodrigo Bressan

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Engenharia Química do Centro Tecnológico da
Universidade Federal de Santa Catarina como
requisito parcial à obtenção do título de Doutor em
Engenharia Química

Prof. Dr. Hugo Moreira Soares
ORIENTADOR

Prof. Dr. Ailton Kunz
COORIENTADOR

Florianópolis
Maio/2012

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Bressan, Cléo Rodrigo

Toxicidade do antibiótico sulfato de colistina empregado na suinocultura sobre processos microbiológicos relacionado ao tratamento de efluentes / Cléo Rodrigo Bressan; orientador, Hugo Moreira Soares; co-orientador, Airton Kunz. – Florianópolis, SC, 2012.

173 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação Em Engenharia Química.

Inclui referências

1. Engenharia Química. 2. Toxicidade. 3. Antibióticos. 4. Nitrificação . 5. Metanogênese. I. Soares, Hugo Moreira. II. Kunz, Airton. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. IV. Título.

Toxicidade do Antibiótico Sulfato de Colistina Empregado na Suinocultura Sobre Processos Microbiológicos Relacionados ao Tratamento de Efluentes

Por

Cleo Rodrigo Bressan

Tese julgada para obtenção do título de Doutor em Engenharia Química, área de Concentração de Desenvolvimento de Processos Químicos e Biotecnológicos, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

Prof. Dr. Hugo Moreira Soares
orientador

Dr. Airton Kuns
co-orientador

Prof. Dr. Leonel Teixeira Pinto
coordenador
Banca Examinadora:

Prof. Dr. Luismar Marques Porto

Prof^a. Dr^a. Débora de Oliveira

Dr^a. Martha Mayumi Higarashi

Prof^a. Dr^a. Regina Vasconcellos Antonio

Prof^a. Dr^a. Valéria Reginatto Spiller

Prof. Dr. Willibaldo Schmidell Netto

Florianópolis, 21 de maio de 2012

Agradecimentos

Primeiramente à minha família, pelo grande incentivo e apoio durante toda a formação acadêmica;

Um agradecimento muito especial à minha esposa Vanessa, por todo o estímulo e companheirismo durante estes anos;

Aos professores Hugo e Airton, pela orientação, compreensão e amizade ao longo de todo o curso;

Ao professor Willibaldo, pela amizade, ensinamentos e pelo grande auxílio prestado para a concepção dos experimentos;

À todos os colegas e amigos do LTBR e da Embrapa Suínos e Aves por toda a ajuda e, especialmente, pela amizade construída ao longo deste período;

À Embrapa Suínos e Aves por permitir a execução de parte do projeto em suas instalações, além da disponibilização de equipamentos e outros materiais utilizados;

Finalmente, à CAPES pelo apoio financeiro.

Sumário

1. Introdução.....	27
2. Objetivos	31
2.1. Objetivos Gerais.....	31
2.2. Objetivos Específicos.....	31
3. Revisão Bibliográfica.....	33
3.1. Suinocultura e meio ambiente.....	33
3.2. Antibióticos – aspectos gerais.....	36
3.2.1. Uso de antibióticos e outros antimicrobianos como promotores de crescimento na suinocultura	38
3.2.2. Implicações do uso de antimicrobianos na biossegurança do processo produtivo	40
3.2.3. Toxicidade de antibióticos sobre processos biológicos de tratamento de efluentes	42
3.2.4. Remoção dos antibióticos em estações de tratamento	45
3.3. Colistina (Polimixina E).....	46
3.4. Biologia da nitrificação	49
3.5. Biologia dos sistemas anaeróbios de biodegradação da matéria orgânica e metanogênese	53
4. Materiais e Métodos	57
4.1. Reatores biológicos	57

4.1.1. Reator nitritante para produção de biomassa (reator NTT)	57
4.1.2. Reator nitrificante para produção de biomassa (reator NTF)	62
4.1.3. Reator nitrificante para experimento de toxicidade crônica (NTF _{tox}).....	64
4.1.4. Reator anaeróbio UASB	66
4.2. Determinações físico-químicas do meio e do efluente dos reatores.....	68
4.2.1. Íons nitrogenados: amônia, nitrito, nitrato	68
4.2.2. Determinação da demanda química de oxigênio (DQO)	69
4.2.3. Determinação da série sólidos (SST, SSV e SSF)	69
4.3. Hibridização fluorescente in situ (FISH).....	70
4.4. Ensaios de toxicidade	71
4.4.1. Toxicidade sobre sistemas nitrificantes	71
4.4.2. Toxicidade sobre a metanogênese acetoclástica	76
5. Resultados e Discussão.....	77
5.1. Toxicidade da colistina sobre a nitrificação	77
5.1.1. Estabelecimento e manutenção reator nitritante (NTT) para produção de biomassa	77
5.1.2. Estabelecimento dos reatores nitrificantes (NTF) para produção de biomassa	83
5.1.3. Toxicidade aguda da colistina sobre a nitrificação	84

5.1.4. Toxicidade crônica da colistina sobre a nitrificação	90
5.2. Toxicidade crônica da colistina sobre a metanogênese.....	102
5.2.1. Estabelecimento do reator UASB.....	102
5.2.2. Toxicidade crônica da colistina sobre a metanogênese.....	77
6. Conclusões.....	107
7. Sugestões para trabalhos futuros.....	109
8. Referências Bibliográficas	111
9. Anexo 3.....	121

Resumo

O modelo atualmente empregado de produção intensiva de suínos implica na utilização de grande quantidade de antimicrobianos para manter a sanidade do rebanho, os quais são utilizados tanto de forma terapêutica como também na forma de promotores de crescimento, neste último caso empregado de forma contínua e em concentrações mais reduzidas que quando utilizado como agente terapêutico. Muitos destes agentes antimicrobianos chegam aos sistemas de tratamento de dejetos ainda sob sua forma ativa, podendo interferir nos processos microbianos envolvidos no tratamento. Os efeitos destes agentes antimicrobianos sobre as comunidades microbianas relacionadas ao tratamento dos efluentes são ainda pouco conhecidos. Este trabalho tem como objetivo geral investigar a toxicidade do antibiótico sulfato de colistina sobre a microbiota nitrificante e metanogênica, os quais são grupos considerados bons indicadores de toxicidade e responsáveis por etapas importantes em sistemas de tratamento de efluentes aeróbios e anaeróbios, respectivamente. Análises de toxicidade aguda revelaram que a colistina possui toxicidade relevante apenas sobre o grupo das bactérias oxidadoras de amônia (BOA), possuindo muito pouca atividade sobre as bactérias oxidadoras de nitrito (BON). Os testes de toxicidade crônica sobre a nitrificação apresentaram resultados similares aos obtidos nos experimentos de toxicidade aguda em relação às concentrações da CI50, com concentrações da ordem de 60 a 70 mg colistina.L⁻¹, porém em concentrações mais elevadas a toxicidade crônica mostrou-se mais severa que a aguda. As concentrações inibitórias encontradas para o grupo das BOA são da mesma ordem de grandeza que aquelas propostas para uso na água como agente terapêutico, sugerindo que nestes casos a colistina poderia representar riscos potenciais para a operação estável de processos de nitrificação, uma vez que a colistina é eliminada pelas fezes quase totalmente sob a forma inalterada. Os testes de toxicidade crônica sobre as arqueas metanogênicas, realizados em reator do tipo UASB, não evidenciaram qualquer toxicidade da colistina sobre este grupo.

Palavras-chave: Toxicidade, antibióticos, nitrificação, metanogênese.

Abstract

Intensive pig farming currently employed involves the use of a large quantity of antimicrobial agents to keep the herd healthy, being used both as therapeutic agents and also as growth promoters, in this latter case used on a continuous basis and also in lower concentrations than when used for therapeutic purposes. Many of these antimicrobial agents get to the wastewater treatment system still in their active forms, and as such they can interfere with the microbial processes involved in the treatment. The effects of these antimicrobial agents on the microbial communities related to wastewater treatment are still not well known. The main aim of this work is to investigate the toxicity of the antibiotic colistin sulfate on the nitrifying and methanogenic microbiota, groups that are considered good indicators of toxicity and also responsible for important biological process within aerobic and anaerobic treatment systems, respectively. Analyses of acute toxicity have shown that colistin has relevant toxicity only on the group of ammonia-oxidizing bacteria (AOB), but have very little activity in relation to nitrite oxidizing bacteria (NOB). Tests of chronic toxicity on nitrification have shown results similar to those obtained in acute toxicity experiments in relation to concentrations of the CI50, with concentrations between 60 and 70 mg.L⁻¹ of colistin, but at higher concentrations the chronic toxicity showed to be more severe than the acute toxicity. The inhibitory concentrations found for the AOB group are at the same order of magnitude as those proposed for use in water as therapeutic agent, suggesting that in these cases colistin could pose a possible risk for the stable operation of nitrification processes, as colistin is eliminated in the faeces almost entirely in unaltered form. The chronic toxicity tests on methanogenic archaea, carried out in a UASB reactor, did not show any toxic effect of colistin on this group.

Keywords: Toxicity, antibiotics, nitrification, methanogenesis.

Lista de figuras

- Figura 1: Exemplos das principais estruturas ou etapas metabólicas afetadas por diversos antibióticos pertencentes a diferentes classes. Adaptado de Madigan *et al.* (2004).38
- Figura 2: Estrutura molecular da colistina (PubChem – CID 5311054).47
- Figura 3: Porcentagem de amônia livre como N (em relação ao total de N presente) e porcentagem de ácido nitroso como N (em relação à quantidade de nitrito presente) para 30 °C (SCHMIDELL NETO e REGINATTO, 2007).52
- Figura 4: Esquema ilustrativo do reator em batelada sequencial (SBR – *Sequencing Batch Reactor*) nitritante, denominado reator NTT, utilizado para produção de bactérias oxidadoras de amônia (BOA). (1) computador, (2) controlador lógico programável (CLP), (3) meio de alimentação, (4) bomba peristáltica de alimentação, (5) bomba compressora de ar, (6) agitador de pás, (7) reator tipo SBR 5L, (8) bomba peristáltica de descarte, (9) efluente descartado.58
- Figura 5: Esquema ilustrativo do reator em batelada sequencial (SBR – *Sequencing Batch Reactor*) utilizado para produção de biomassa nitrificante. (1) computador, (2) controlador lógico programável, (3) meio de alimentação, (4) bomba peristáltica de alimentação, (5) bomba compressora de ar, (6) reator tipo SBR 1,5L, (7) agitador magnético, (8) bomba peristáltica de descarte, (9) efluente descartado.63
- Figura 6: Esquema ilustrativo do reator anaeróbio de fluxo ascendente (UASB – *Upflow Anaerobic Sludge Blanket*) utilizado para testes de toxicidade crônica de

antimicrobianos e produção de biomassa para testes de toxicidade aguda. (1) gasômetro de cúpula flutuante, (2) contador de ciclos, (3) válvula solenóide, (4) meio de alimentação, (5) bomba peristáltica alimentação, (6) reator tipo UASB 6 L, (7) descarte efluente. 66

Figura 7: Exemplo ilustrativo de uma respirometria realizada no reator NTF. O coeficiente angular da reta representa o decréscimo na concentração de oxigênio dissolvido em $\text{mg O}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 75

Figura 8: Concentração das formas nitrogenadas no período inicial de enriquecimento e aclimação da biomassa nitritante. 77

Figura 9: Concentração das formas nitrogenadas presentes no meio de cultura e no efluente após transferência para reator 5 L (reator NTT). Após a transferência da biomassa a contagem dos dias de operação foi reiniciada. 78

Figura 10: Fração de nitrito oxidada a nitrato observada no reator nitritante (NTT) ao longo da operação do reator. 79

Figura 11: Fotomicrografia obtida por microscopia de epifluorescência de células oxidadoras de amônia identificadas por hidrização fluorescente in situ (FISH) utilizando a sonda Nso190. 80

Figura 12: Fotomicrografias obtidas por microscopia de epifluorescência para as sondas NIT3 (A) e Amx820 (B), específicas para espécies do gênero *Nitrobacter* (oxidadoras de nitrito) e ANAMMOX, respectivamente. 81

Figura 13: A imagem no alto corresponde à uma secção transversal do material aderido sobre a lâmina de FISH reconstituída tridimensionalmente a partir de uma sequência vertical de imagens capturadas em microscopia confocal de varredura a laser, com elevação do plano focal de $0,1 \mu\text{m}$ a cada captura. As duas imagens abaixo desta

correspondem às imagens capturadas nos planos focais 1 e 2 indicados na figura superior, sendo que o quadro amarelo presente em ambas as imagens representa a área utilizada para renderização da imagem visualizada acima a partir da superposição das imagens.	82
Figura 14: Variação das formas nitrogenadas no efluente final do reator e no meio de alimentação durante a fase inicial de estabelecimento da nitrificação completa no reator NTF.....	83
Figura 15: Acúmulo de nitrito em função da concentração de colistina (mg.L^{-1}) em experimento de toxicidade aguda realizado com BOA e colistina comercial (colistina _{com}). A seta indica o momento de introdução do antibiótico, e o quadro delimita os pontos considerados para obtenção das velocidades de formação.	85
Figura 16: Correlação entre o grau de inibição sobre a nitrificação e a concentração de colistina comercial (colistina _{com}). (A) Inibição em função da concentração de colistina, apresentando apenas a faixa de inibição; (B) Inibição em função do logaritmo da concentração de colistina.	87
Figura 17: Correlação entre o grau de inibição e a concentração de colistina pura (colistina _{mp}). (A) Inibição em função da concentração de colistina, apresentando apenas a faixa de inibição; (B) Inibição em função do logaritmo da concentração de colistina.	88
Figura 18: Acúmulo de nitrato nos frascos ao longo de um dos experimentos de toxicidade aguda da colistina sobre as BON.	63
Figura 19: Diagrama pC-pH (log da concentração relativa dos compostos <i>versus</i> pH) onde é apresentada a distribuição das formas químicas do sistema carbonato em função do pH, onde $[\text{CO}_{2(\text{aq})}] + [\text{HCO}_3^-] + [\text{CO}_3^{2-}] = 1$. Está destacado no	

a concentração relativa de $\text{CO}_{2(\text{aq})}$ para o pH 7,5 (elaborado de acordo com Snoeyink e Jenkins (1980)).....	91
Figura 20: Velocidade de respiração celular obtidas em função da concentração de bicarbonato adicionada ao reator.	92
Figura 21: Acompanhamento da concentração de nitrogênio amoniacal e da velocidade de respiração ao longo de um ciclo do reator SBR (fase de reação apenas). Dados obtidos no 67º dia de operação do reator, antes do início da adição de colistina ao reator.....	94
Figura 22: Velocidade global de consumo de amônia (QNATX) e de oxigênio QO_2X e concentração de biomassa ao longo do experimento. O espaço de tempo entre cada ciclo apresentado é variável.	95
Figura 23: Variação nas concentrações de SST e nas velocidades globais e específicas de consumo de O_2 . O espaço de tempo entre cada ciclo apresentado é variável.	96
Figura 24: Variação da atividade específica de consumo de O_2 em função da concentração de biomassa no reator a partir dos dados apresentados na Figura 23.....	96
Figura 25: Representação gráfica do procedimento de normalização aplicado aos dados de velocidade específica de consumo de oxigênio (QO_2). QO_{2a^*} e QO_{2b^*} são valores calculados a partir do modelo obtido de variação relativa da atividade específica em função da concentração de biomassa.	97
Figura 26: Valores de QO_2 , QO_{2^*} e concentração de SST durante o período de análise da toxicidade crônica da colistina sobre a biomassa nitrificante. O espaço de tempo entre cada ciclo apresentado é variável.	98
Figura 27: Velocidade específica de consumo de oxigênio em função do logaritmo da concentração de colistina. Dados brutos (QO_2) e normalizados para 1g SST (QO_{2^*}).....	98

Figura 28: Desempenho do reator NTF_{tox} ao longo do período de operação. São apresentadas as concentrações das formas nitrogenadas no efluente final (N-NAT, $N-NO_2^-$ e $N-NO_3^-$) e na alimentação (N-NAT) e concentração de colistina no meio de cultura.....	100
Figura 29: Eficiência de remoção da amônia durante os ciclos e concentração de colistina aplicada ao longo do experimento.....	101
Figura 30: Variação na velocidade global de consumo de oxigênio ao longo de um ciclo monitorado ao final do experimento.....	102
Figura 31: Carga orgânica volumétrica aplicada e DQO afluente e efluente do reator anaeróbio tipo UASB utilizado para aclimatação da biomassa metanogênica.....	103
Figura 32: DQO afluente e efluente do reator anaeróbio tipo UASB e concentração de colistina durante o período de avaliação da toxicidade crônica.	104
Figura 33: Percentual de redução da DQO durante o período de operação do reator em que foi realizado o teste de toxicidade crônica.	104
Figura 34: Produção de biogás diária durante o período de operação do reator em que foi realizado o teste de toxicidade crônica.	105

Lista de tabelas

Tabela 1: Composição química média dos dejetos de suínos observada por diferentes autores (mg.L^{-1}) (KUNZ, 2006).....	33
Tabela 2: Lista dos aditivos proibidos na alimentação animal no Brasil e legislação correspondente.	40
Tabela 3: Concentração Inibitória Mínima de diversos antibióticos para dois agentes patogênicos (<i>Clostridia</i> e <i>Enterococci</i>) e dosagens comumente utilizadas destes medicamentos quando utilizados como aditivos alimentares. Adaptado de SOU (1997).	43
Tabela 4: Composição do meio de cultura sintético adaptado de Tanaka (1981).	59
Tabela 5: Composição da solução de micronutrientes (Tanaka, 1981).	33
Tabela 6: Condições de cultivo para os reatores nitritantes ($\text{NTT}_{\text{parcial}}$ e NTT).	60
Tabela 7: Condições de cultivo para os reatores NTF.	64
Tabela 8: Condições de cultivo para o reator NTF_{tox} durante experimento de toxicidade crônica.	65
Tabela 9: Meio de cultura reator anaeróbico (para DQO final de 1g/L), sendo que a concentração de DQO foi aumentada gradativamente sempre que o reator estabilizava a fração de remoção de DQO.	67
Tabela 10: Composição da solução de micronutrientes utilizada no reator aneróbico.	67
Tabela 11: Condições operacionais empregadas no reator UASB. ...	68
Tabela 12: Relação das sondas oligonucleotídicas que serão utilizadas neste trabalho para análise por FISH e respectivas especificidades. Referências conforme Nielsen et al. (2009).	70

Tabela 13: Percentuais de inibição encontrados nos experimentos de toxicidade aguda para a colistina comercial e para a colistina pura proveniente da indústria. Foram testadas diferentes concentrações de antibióticos variando de 10^{-1} a $10^{2,5}$ mg colistina.L ⁻¹	86
--	----

Lista de Abreviaturas

ANAMMOX – *Anaerobic ammonium oxidation*

BOA – Bactérias oxidadoras de amônia

BON – Bactérias oxidadoras de nitrito

CI-50 – Concentração de um agente inibidor suficiente para ocasionar a redução da atividade celular em 50%.

CLP – Controlador lógico programável

CNTP – Condições naturais de temperatura e pressão

Colistina_{com} – Formulação comercial de sulfato de colistina contendo 70% de lactose como veículo

Colistina_{mp} – Sulfato de colistina utilizado como matéria-prima na formulação da colistina comercial.

DQO – Demanda química de oxigênio

DAPI – 4'-6 – diamidino-2-fenilindol

ETDS – Estação de Tratamento de Dejetos de Suínos (Embrapa Suínos e Aves)

FA - Formamida

FISH – *Fluorescent in situ hybridization*

K_s – Constante de saturação

LPS – Lipopolissacarídeos

NA – Nitrogênio amoniacal

NAT – Nitrogênio amoniacal total

NTF – Reator nitrificante empregado para produção de células nitrificantes

NTF_{tox} – Reator nitrificante empregado em testes de toxicidade crônica

NTT – Reator nitritante empregado para produção de células nitritantes

NTT_{parcial} – Reator nitritante para pré-enriquecimento da biomassa nitritante utilizada para inóculo do reator NTT

OD – Oxigênio dissolvido

PCB – Bifenilas policloradas (*polychlorinated biphenyl*)

QNAT – Velocidade específica de consumo do nitrogênio amoniacal

QNAT* - Velocidade específica de consumo do nitrogênio amoniacal normalizada em função da concentração de biomassa conforme modelo experimental obtido

QNATX – Velocidade global de oxidação do nitrogênio amoniacal total

QO₂ – Velocidade específica de consumo do oxigênio dissolvido

QO₂* – Velocidade específica de consumo do oxigênio dissolvido normalizada em função da concentração de biomassa conforme modelo experimental obtida

QO₂X – Velocidade global de consumo do oxigênio dissolvido

rpm – Rotações por minuto

SBR – *Sequencing Batch Reactor*

SHARON - *Single Reactor High Activity Ammonium Removal over Nitrite*

SSF – Sólidos suspensos fixos

SST – Sólidos suspensos totais

SSV – Sólidos suspensos voláteis

TRH – Tempo de retenção hidráulica

UASB – *Upflow anaerobic sludge blanket*

1. Introdução

Atualmente, a atividade agropecuária vem apresentando uma tendência mundial de aumento na escala de produção, concentrando a criação em grandes propriedades altamente tecnificadas, com vistas à redução de custos (STEINFELD *et al.*, 2006). O modelo de produção industrial de suínos adotado no Brasil tem seguido esta mesma tendência, concentrando cada vez mais a produção em grandes unidades produtoras, o que torna ainda mais emergencial o desenvolvimento de tecnologias adequadas para o tratamento dos resíduos gerados e para a racionalização do uso dos recursos hídricos disponíveis (KUNZ, MIELE e STEINMETZ, 2009).

O Brasil encontra-se em 4º lugar no ranking de produção e exportação de carne suína, com um crescimento médio anual de 4%, sendo os estados de Santa Catarina, Paraná e Rio Grande do Sul os maiores produtores nacionais. Em relação às exportações, estima-se que a representatividade do mercado brasileiro de carne suína saltará de 10,1%, em 2008, para 21% em 2018/2019 (fonte: <http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/suinos> – acessado em 14/12/2011).

O modelo de produção industrial atualmente empregado, contudo, implica na utilização regular de uma quantidade significativa de antimicrobianos para assegurar a sanidade do plantel. O adensamento de um elevado número de animais em grandes unidades de produção dificulta a contenção de patógenos ocasionais sem a adoção do uso de antimicrobianos como mecanismo de controle. Estes compostos são utilizados tanto de forma terapêutica como também sob a forma de aditivos alimentares, onde são empregados em concentrações mais reduzidas adicionadas à ração ou à água dos animais. Os reais impactos do uso massivo destes compostos na produção de carnes ainda são desconhecidos, mas muita preocupação tem sido despertada em relação à sua importância sobre o desenvolvimento de cepas multirresistentes no sistema produtivo e no meio ambiente, assim como, e principalmente, em relação à possível transferência destes genes de resistência para patógenos humanos (BAQUERO, MARTINEZ e CANTON, 2008; KÜMMERER, 2009b).

Outro aspecto pouco conhecido refere-se aos potenciais impactos do uso destes antibióticos sobre os processos biológicos

relacionados ao tratamento de efluentes. De um modo geral, os efluentes da suinocultura são tratados por processos essencialmente biológicos e poderiam ter a sua eficiência, em teoria, comprometida pela presença de compostos citotóxicos como os antibióticos. Tanto os processos anaeróbios como os processos aeróbios, dependem da participação de grupos microbianos específicos que poderiam ser afetados pela presença destes compostos nos efluentes.

A colistina é um antibiótico que vem sendo amplamente utilizado como aditivo alimentar na suinocultura e também na criação de outros animais, mas ao contrário da maioria dos demais antimicrobianos utilizados com este propósito, a colistina possui atividade específica sobre bactérias gram-negativas (EMEA, 2002). Sua presença nos efluentes do processo produtivo, desta forma, poderia representar um potencial risco para a operação estável dos processos microbianos envolvidos no tratamento dos efluentes, visto que os organismos envolvidos são frequentemente gram-negativos.

A nitrificação é um dos processos que pode potencialmente ser afetado pela presença da colistina, uma vez que este processo depende do estabelecimento de dois grupos de bactérias gram-negativas: as bactérias oxidadoras de amônia (BOA) e as bactérias oxidadoras de nitrito (BON). Comumente a desnitrificação também é realizada por organismos gram-negativos, porém a grande diversidade filogenética dos organismos gram-negativos envolvidos neste processo pode conferir maior capacidade adaptativa à presença do antimicrobiano para este grupo. Adicionalmente, diversas espécies de organismos desnitrificantes gram-positivos também têm sido descritas, inclusive em estações de tratamento de efluentes (VERBAENDERT *et al.*, 2011).

De forma análoga, outros processos, como a digestão anaeróbia, poderiam também ser afetados pela presença destes compostos. As arqueas metanogênicas, apesar de não serem propriamente bactérias, também apresentam sensibilidade a uma série de compostos antibacterianos (DWORKIN *et al.*, 2006) e outros compostos inibidores/tóxicos (TABATABAEI *et al.*, 2010). Tanto as bactérias nitrificantes quanto as metanogênicas desempenham um papel fundamental nos processos de tratamento dos quais participam, de modo que é imperativo um entendimento mais preciso sobre a forma como estes organismos respondem aos inibidores comumente presentes nos efluentes da suinocultura, como antibióticos, por exemplo.

A escolha das arqueas metanogênicas e das bactérias nitrificantes para avaliação da toxicidade da colistina sobre a microbiota relacionada ao tratamento de efluentes fundamenta-se, principalmente, no fato de que estes microrganismos encontram-se entre os grupos de procariotos mais sensíveis à ação de compostos inibidores em sistemas anaeróbios e aeróbios, respectivamente (BLUM e SPEECE, 1991), sendo considerados bons indicadores de toxicidade para os sistemas microbianos onde ocorrem (MASSONE *et al.*, 1998; REN, 2004; CARUCCI, CAPPAL e PIREDDA, 2006).

O uso de bactérias nitrificantes como biosensores de inibidores em ambientes aeróbios já está bem estabelecido na literatura científica, usualmente utilizando lodo ativado nitrificante (CARUCCI, CAPPAL e PIREDDA, 2006; ALIGHARDASHI *et al.*, 2009) ou bactérias nitrificantes isoladas (GRUNDITZ e DALHAMMAR, 2001; WANG e GUNSCH, 2011). Adicionalmente, o conhecimento da toxicidade sobre o grupo das nitrificantes é de grande relevância uma vez que, em sistemas aeróbios, são estas bactérias as principais responsáveis pela oxidação de muitos compostos xenobióticos, dentre eles diversos antibióticos e outros fármacos (BATT, KIM e AGA, 2006; GHOSH *et al.*, 2008; KIM *et al.*, 2008).

Não foi encontrado na literatura informações relatando níveis de colistina em efluentes da suinocultura ou outro tipo de efluente, mas o fato de apresentar boa estabilidade e ser eliminada de forma praticamente inalterada pelo trato intestinal quando utilizada por via oral, permite estimar que as concentrações do antimicrobiano nos efluentes poderia atingir níveis expressivos do ponto de vista microbiológico.

Seu uso já havia sido abandonado há algum tempo na prática médica em função de potenciais efeitos colaterais, restringindo-se basicamente ao emprego como promotor de crescimento na produção animal. Recentemente, porém, vem tendo o seu uso reavaliado na medicina humana como alternativa bastante promissora a ser utilizada como última barreira para o controle de cepas multirresistentes de bactérias como *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* e *Klebsiella pneumoniae* (LI *et al.*, 2006). Desta forma, a importância do conhecimento dos efeitos deste antibiótico sobre as comunidades microbianas dos sistemas biológicos de tratamento toma uma dimensão que ultrapassa a da produção pecuária. A possibilidade de estes ambientes atuarem como “reservatório” de genes de resistência para a

colistina é uma questão que passa a ter importância também do ponto de vista da saúde humana.

2. Objetivos

2.1. Objetivos Gerais

Avaliar a toxicidade aguda e crônica (acumulativa) do antibiótico sulfato de colistina (polimixina E) sobre a microbiota nitrificante e a toxicidade crônica sobre a microbiota metanogênica. Busca-se a obtenção de dados que auxiliem uma compreensão mais ampla dos potenciais impactos da presença de colistina nos dejetos de suínos sobre os sistemas biológicos relacionados à nitrificação e à metanogênese nos sistemas de tratamento biológico.

2.2. Objetivos Específicos

- Estabelecimento (partida e manutenção) de um reator nitritante e outro nitrificante, ambos em escala de bancada e do tipo SBR (*Sequencing Batch Reactor*), objetivando o fornecimento de biomassa para os experimentos de toxicidade aguda sobre as bactérias oxidadoras de amônia (BOA) e bactérias oxidadoras de nitrito (BON), respectivamente;
- Estabelecimento (partida e manutenção) de um reator nitrificante do tipo SBR em escala de bancada para uso posterior em experimentos de toxicidade crônica sobre as bactérias nitrificantes (BOA+BON);
- Estabelecimento (partida e manutenção) de um reator anaeróbico do tipo UASB (*Upflow Anaerobic Sludge Blanket*) em escala de bancada para uso posterior em experimentos de toxicidade crônica sobre as arqueas metanogênicas;
- Avaliação da toxicidade aguda da colistina sobre as BOA e sobre as BON através de experimentos com frascos agitados;

- Avaliação dos efeitos da exposição prolongada à colistina sobre a nitrificação em um reator do tipo SBR em escala de bancada (toxicidade crônica) previamente estabelecido;
- Avaliação dos efeitos da exposição crônica à colistina sobre a metanogênese acetotrófica em um reator do tipo UASB em escala de bancada previamente estabelecido.

3. Revisão Bibliográfica

3.1. Suinocultura e meio ambiente

O modelo de produção atualmente empregado na suinocultura caracteriza-se pela geração de um grande volume de efluentes com forte potencial poluidor. De um modo geral, estes efluentes representam uma mistura complexa de urina e fezes com elevada quantidade de matéria orgânica e nutrientes (Tabela 1) (KUNZ, 2006), frequentemente apresentando também uma concentração significativa de antibióticos e hormônios (ADAMS, 2008).

Tabela 1: Composição química média dos dejetos de suínos observada por diferentes autores (mg.L⁻¹) (KUNZ, 2006).

Grandeza	Duarte <i>et al.</i> 1992 (Portugal)	Sevrin-Reyssac <i>et al.</i> 1995 (França)	Medri 1997 (SC/Brasil)	Zanotelli 2002 (SC/Brasil)	Kunz <i>et al.</i> 2005 (SC/Brasil)
pH	7,46	-	6,9	6,87	7,3
DQO total	21.670	80.000	21.647	26.387	65.090
DBO ₅ total	7.280	40.000	11.979	-	34.300
NTK	2.150	8.100	2.205	2.539	4.530
NH ₃	1.420	3.400	-	-	2.520
P total	-	7.100	633	1.215	1.600
Sólidos totais	-	82.000	17.240	22.867	-
Sólidos voláteis	-	66.000	10.266	16.855	39.220

A composição do efluente gerado no processo produtivo é variável em função da alimentação do animal e do tipo de manejo adotado. Procedimentos que resultam na minimização da utilização de água no processo, por exemplo, resultam de um modo geral em efluentes com maior fração de fezes e urina e, portanto, maiores concentrações de matéria orgânica e nutrientes.

No Brasil, a maior parte dos efluentes tem como destino final o reuso agrícola como fertilizante, com ou sem tratamento prévio. Neste

contexto, não somente a remoção de nutrientes, mas também a nitrificação não são processos desejados. Apesar de ambas as formas de nitrogênio poderem ser assimiladas pelas plantas, o nitrato apresenta-se muito mais solúvel no solo que o nitrogênio amoniacal. O nitrogênio amoniacal apresenta-se geralmente ionizado no solo, sob a forma do íon amônio (NH_4^+), de modo que suas cargas positivas interagem com as cargas negativas da argila. De fato, o uso de inibidores da nitrificação em fertilizantes tem resultado em um aumento da eficiência de fertilização e contribuído para reduzir a contaminação das águas pelo nitrato lixiviado dos solos fertilizados (MADIGAN, MARTINKO e PARKER, 2004).

A grande quantidade de nutrientes presentes nestes dejetos, muitas vezes em concentrações desproporcionais para uma fertilização eficiente, implica na disponibilização de extensas áreas agrícolas para disposição destes resíduos, além do balanceamento prévio dos nutrientes para melhor aproveitamento pelas plantas e, consequentemente, redução da lixiviação dos nutrientes aplicados no solo (SEGANFREDO, 1999). Deste modo, o aumento contínuo na escala de produção, com geração de elevados volumes de dejetos, tem dificultado a reutilização do dejetos para fins agrícolas, gerando a demanda por processos de tratamento tecnicamente mais avançados.

Frequentemente, a área de lavoura disponível nas regiões produtoras é insuficiente e a aplicação excessiva de dejetos nestas áreas resulta na contaminação dos recursos hídricos locais (HALL, 1999; WANG, MAGESAN e BOLAN, 2004). Nutrientes, patógenos, metais, fármacos e outros contaminantes provenientes da lixiviação e/ou percolação destes compostos em solos adubados de forma inadequada chegam aos corpos hídricos superficiais e subterrâneos das regiões produtoras, resultando na contaminação destes ambientes (DE LA TORRE *et al.*, 2000; KUNZ, 2006; STEINMETZ *et al.*, 2009). Outro fator agravante refere-se ao fato de que os projetos de reuso na agricultura, frequentemente, baseiam-se somente nas quantidades de nitrogênio, fósforo e potássio para determinar os volumes aplicados, desconsiderando a quantidade aplicada de contaminantes como fármacos, patógenos e metais (DE LA TORRE *et al.*, 2000). No Brasil, uma resolução do CONAMA (resolução CONAMA 420, 28 de Dezembro de 2009) estabelece os critérios e valores orientadores para o monitoramento da qualidade do solo e de águas subterrâneas em relação à presença de diversos nutrientes e outros compostos inorgânicos,

hidrocarbonetos aromáticos voláteis e policíclicos aromáticos, diversos organoclorados, fenóis, e PCBs (bifenilas policloradas).

Quando a reutilização dos dejetos para fins agrícolas é inviável, sistemas mais complexos de tratamento, que envolvam inclusive a remoção de nutrientes como o nitrogênio e o fósforo, precisam ser utilizados para permitir a adequação do efluente para lançamento nos corpos hídricos (FERNANDES *et al.*, 2012). Estações compactas de tratamento têm sido propostas para possibilitar o tratamento avançado dos dejetos, frequentemente envolvendo a utilização integrada de processos físico-químicos, aeróbios e anaeróbios (VANOTTI *et al.*, 2007; KUNZ, MIELE e STEINMETZ, 2009; KUNZ, STEINMETZ e BORTOLI, 2010). A biodigestão anaeróbia é muitas vezes o processo priorizado nos sistemas propostos, não apenas em função da produção do biogás, mas também devido ao custo mais reduzido e menor complexidade operacional das unidades de tratamento. Porém, a grande quantidade de nutrientes, especialmente o nitrogênio, implica na utilização de processos adicionais para adequação do efluente para liberação nos corpos hídricos ou para o reciclo, geralmente incluindo processos de nitrificação e desnitrificação heterotrófica.

Visando a racionalização no consumo de água e a redução na geração de efluentes, uma das alternativas que está sendo avaliada na suinocultura é a possibilidade de reciclo do efluente tratado, o qual seria utilizado essencialmente para operações de limpeza das instalações (VANOTTI *et al.*, 2007). Neste contexto, a presença de patógenos e compostos bioativos no efluente, como antibióticos, é de grande relevância do ponto de vista da biossegurança no processo produtivo.

Além das questões de biossegurança envolvidas na prática do reciclo do efluente, como a potencial disseminação de patógenos e desenvolvimento de cepas resistentes a antibióticos, outra possível consequência da implementação do reciclo seria um aumento na concentração de compostos recalcitrantes no efluente final. Muitos antibióticos amplamente empregados na suinocultura apresentam remoção limitada nos sistemas de tratamento, e teriam, em função do reciclo, sua concentração possivelmente aumentada no efluente final. Muitos antimicrobianos chegam aos corpos hídricos sob sua forma ativa, sendo ainda relativamente desconhecido o real impacto de sua presença no meio ambiente (LOFTIN *et al.*, 2005; BAQUERO, MARTINEZ e CANTON, 2008; KÜMMERER, 2009a). A presença de antimicrobianos no efluente do processo produtivo poderia também

afetar negativamente o desempenho das unidades de tratamento biológico, influenciando na qualidade final do efluente e, consequentemente, na qualidade da água de reciclo.

A presença destes compostos nos dejetos, bem como sua remoção, são questões comumente ignoradas na suinocultura, mas de grande relevância tanto do ponto de vista mais amplo da biossegurança, devido aos possíveis mecanismos de desenvolvimento de resistências, como do ponto de vista mais prático em função do seu potencial inibitório sobre os processos biológicos de tratamento, podendo comprometer e sua eficiência.

3.2. Antibióticos – aspectos gerais

Antibióticos, em um sentido amplo, são agentes quimioterápicos que inibem ou interrompem completamente o crescimento de organismos como bactérias, fungos ou protozoários. Outros termos comumente usados são quimioterapêuticos ou antimicrobianos, no entanto, estes termos não são sinônimos. Antimicrobianos, por exemplo, podem ser efetivos também contra viroses. A expressão quimioterápicos refere-se de forma mais genérica a compostos que matam células, especificamente microrganismos ou células cancerígenas. Atualmente, o termo antibiótico é frequentemente usado referindo-se a compostos com atividade seletiva contra bactérias, fungos ou parasitas (KÜMMERER, 2009a). Alguns autores definem antibióticos a partir da sua origem, considerando apenas como antibióticos aqueles de origem natural provenientes da síntese microbiana, assim como derivados destes (MADIGAN, MARTINKO e PARKER, 2004). Neste trabalho, o termo antibiótico é utilizado para definir um grupo de compostos naturais, semissintéticos ou sintéticos que sejam utilizados com o propósito de conter o crescimento de bactérias, fungos ou protozoários *in vivo*, apresentando como principal característica a seletividade sobre a célula alvo.

Os primeiros estudos com antibióticos foram realizados já no início do século XX, quando Paul Ehrlich desenvolveu o conceito de toxicidade seletiva e deu início à busca por compostos que apresentassem esta característica, permitindo a sua utilização *in vivo*.

Porém, o desenvolvimento desta área só aconteceu de fato nas décadas de 40 e 50, com a descoberta e isolamento dos primeiros antibióticos naturais, como as penicilinas, tetraciclina e macrolídeos, que apresentavam uma eficiência e espectro de ação extremamente superiores aos antibióticos sintéticos da época (MADIGAN, MARTINKO e PARKER, 2004). Atualmente, a maioria dos antibióticos utilizados continua sendo obtida a partir de microrganismos ou representam modificações químicas dos compostos naturais.

Os antibióticos são comumente classificados tanto pela sua estrutura química como pelo seu mecanismo de ação, sendo que, de um modo geral, substâncias de um mesmo grupo apresentam também um mecanismo de ação similar. Dentre as classes mais conhecidas podem-se citar os antibióticos β -lactâmicos, tetraciclina, macrolídeos e outros.

Os mecanismos de ação através dos quais os antibióticos inibem ou destroem os organismos alvo são variados (Figura 1), geralmente agindo sobre a parede celular ou sobre a síntese proteica e ocasionando a inibição do crescimento ou mesmo a morte celular. Em geral, os antibióticos com ação sobre a síntese proteica ligam-se de forma reversível aos seus sítios de ligação, ocasionando assim uma inibição reversível do crescimento. Uma vez que a inibição do antibiótico cessa, o organismo volta a se desenvolver. Já antibióticos com ação sobre a permeabilidade da membrana plasmática, como a colistina, ocasionam em geral a perda irreversível de constituintes citoplasmáticos resultando na morte da célula (VAARA, 2009).

Da mesma forma que os microrganismos desenvolveram mecanismos de ataque químico com os antibióticos, também foram desenvolvidas ao longo da evolução estratégias de defesa para resistir a estes compostos. Os mecanismos envolvidos no desenvolvimento de resistência aos antimicrobianos são bastante variados. Muitas vezes os genes relacionados à resistência são transmitidos através de unidades móveis de DNA, como plasmídeos, permitindo a sua transferência horizontal entre diferentes espécies. O controle do desenvolvimento de resistência por parte dos patógenos é hoje um dos principais desafios a ser superado para a manutenção do uso dos antibióticos, tanto na medicina humana como na prática veterinária.

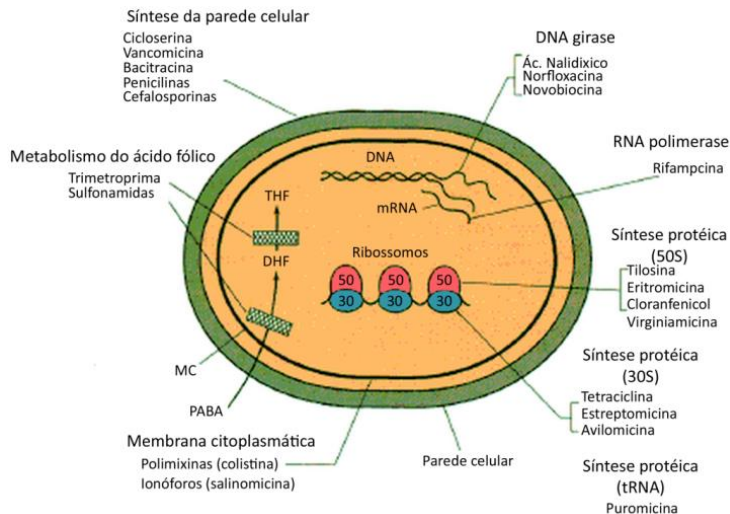


Figura 1: Exemplos das principais estruturas ou etapas metabólicas afetadas por diversos antibióticos pertencentes a diferentes classes. Adaptado de Madigan *et al.* (2004).

3.2.1. Uso de antibióticos e outros antimicrobianos como promotores de crescimento na suinocultura

O modelo de produção intensiva adotado atualmente, concentrando grandes quantidades de animais em espaços reduzidos, implica na utilização de grandes quantidades de antibióticos para manutenção da sanidade no rebanho. Estes antibióticos são empregados na produção animal não apenas de forma terapêutica, mas também de forma preventiva, ou ainda como aditivos alimentares (promotores de crescimento) (EDQVIST e PEDERSEN, 2001; ADAMS, 2008).

O uso dos antimicrobianos como promotores de crescimento foi descoberto já nos anos 40, quando, ao suplementar a ração de frangos com resíduo de fermentação da indústria de tetraciclina, visando a sua utilização como fonte de vitamina B₁₂, observou-se um incremento no ganho de peso das aves que não era resultante da vitamina, mas sim

devido ao resíduo de tetraciclina presente. A partir daí, a prática do uso de doses sub-terapêuticas de antimicrobianos na alimentação passou a ser amplamente adotada, tornando-se mesmo parte integrante dos atuais sistemas modernos de produção industrial (EDQVIST e PEDERSEN, 2001).

A ação dos antibióticos e outros antimicrobianos como promotores de crescimento ocorre predominantemente no lúmen intestinal. Os processos envolvidos incluem a remoção seletiva de organismos patogênicos da flora intestinal, ocasionando uma redução na produção de compostos tóxicos no intestino (como a amônia), e reduzindo ainda a competição com microrganismos benéficos do sistema digestivo. Observam-se ainda, em alguns casos, modificações morfológicas no intestino em resposta às condições mais favoráveis, resultando em um aumento na absorção de nutrientes. A ação metabólica de antibióticos foi demonstrada em alguns casos, mas considerada insuficiente para justificar o ganho de peso apresentado pelos animais com dieta suplementada com antibióticos (SOU, 1997).

É relevante ressaltar que a ação benéfica dos antibióticos está inversamente relacionada com as condições sanitárias do ambiente. Em condições ideais de higiene o efeito dos antibióticos é mínimo, confirmando o seu mecanismo de ação atuando sobre bactérias responsáveis pelo baixo rendimento nos animais (SOU, 1997). Assim, especula-se que granjas com melhores técnicas de manejo para maximizar o controle sanitário do rebanho, sofrerão menores impactos sobre a produtividade com a proibição do uso dos antimicrobianos na alimentação animal do que as granjas menos estruturadas (HAYES, JENSEN e FABIOSA, 2002).

Atualmente, é crescente a pressão para a redução no emprego de antibióticos e outros agentes antimicrobianos como aditivos alimentares. A Europa já banuiu o seu uso e mesmo nos Estados Unidos há crescentes restrições em relação a esta prática. Também no Brasil diversos produtos já se encontram proibidos para uso como aditivos alimentares (Tabela 2).

Outros 10 antibióticos, atualmente ainda permitidos no Brasil para uso como aditivos alimentares, encontram-se em avaliação quanto à sua segurança por um grupo de trabalho criado pelo Ministério da Agricultura (Portaria do MAPA nº 40/06). Os antibióticos em análise são a bacitracina de zinco, espiramicina, virginamicina, fosfato de

tilosina, avilamicina, flavomicina, enramicina, monensina, maduramicina e salinomicina.

Tabela 2: Lista dos aditivos proibidos na alimentação animal no Brasil e legislação correspondente.

Aditivo	Legislação
Avoparcina	Of. Circular DFPA Nº 047/98
Cloranfenicol e Nitrofuranos	IN 09, 27/06/2003
Arsenicais e antimoniais	Portaria 31, 29/01/2002
Anfenicóis, tetraciclinas, beta lactâmicos (benzilpenicilâmicos e cefalosporinas) quinolonas e sulfonamidas sistêmicas	IN 26 09/07/2009 (revoga Portaria 193, 12/05/1998)
Olaquinox	IN 11, 24/11/2004
Violeta Genciana	IN 34, 13/09/2007
Carbadox	IN 35, 14/11/2005
Anabolizantes para bovinos	IN 55, 01/12/2011 (revoga IN 10, 27/04/2001)
Hormônios como aditivos alimentares em aves	IN 17, 18/06/2004

Fonte: <http://www.agricultura.gov.br/animal/alimentacao/aditivos/aditivos-proibidos> – acessado em 01/05/2012

Além destes antimicrobianos em análise e da colistina, outros antimicrobianos autorizados para uso como aditivos alimentares na suinocultura brasileira até o presente momento são: eritromicina, halquinol, lincomicina, tiamulina e clorexidina (fonte: <http://www.agricultura.gov.br/animal/alimentacao/aditivos/aditivos-autorizados> – acessado em 01/05/2012).

3.2.2. Implicações do uso de antimicrobianos na biossegurança do processo produtivo

Normalmente, a maior preocupação em relação ao uso contínuo de antibióticos na produção pecuária refere-se à possibilidade de

transferência de genes de resistência selecionados por estes antibióticos para bactérias patogênicas humanas (BAQUERO, MARTINEZ e CANTON, 2008) e, ainda, a seleção de cepas resistentes em humanos pela presença residual de muitos destes antibióticos nas carnes consumidas. Desde os anos 60 já se sabe que genes de resistência podem ser transferidos de uma célula para outra por meio de elementos genéticos móveis. Desta forma, genes de resistência podem ser transferidos para células de espécies e até mesmo gêneros diferentes (EDQVIST e PEDERSEN, 2001).

Trabalhos recentes demonstram o desenvolvimento de resistência em microrganismos de lagoas de tratamento de dejetos suínos em função do amplo uso de antimicrobianos, bem como a persistência destes compostos nos sistemas de tratamento (JINDAL *et al.*, 2006; MACAULEY *et al.*, 2006). Estudos feitos na Dinamarca e Suécia com cepas de *Streptococcus suis*, um patógeno comum em suínos e passível de ser transmitido ao homem através do consumo da carne contaminada, demonstraram um aumento na frequência de cepas resistentes para dois antimicrobianos de uso muito comum na suinocultura, a tilosina e a tetraciclina (AARESTRUP *et al.*, 1998). Adicionalmente, amostras de *Escherichia coli* isoladas de criatórios de suínos do sul do Brasil demonstraram um alto índice de resistência a antibióticos como a tetraciclina, o sulfazotrim (sulfametoxazol + trimetoprim) e a trimetoprim, verificando ainda um aumento na ocorrência de resistência múltipla (COSTA *et al.*, 2006).

No caso do reciclo do efluente, a preocupação com o manejo de resistências torna-se ainda mais relevante, uma vez que um possível reciclo de patógenos resistentes e uma exposição contínua a antibióticos não removidos no sistema de tratamento aumentaria, provavelmente, a velocidade no desenvolvimento e seleção de cepas resistentes no plantel. Grande parte dos antibióticos utilizados no sistema produtivo são excretados de forma inalterada ou como metabólitos intermediários da degradação, chegando aos sistemas de tratamento muitas vezes sob sua forma ativa (LOFTIN *et al.*, 2005; ADAMS, 2008). Sabe-se que concentrações sub-inibitórias de antibióticos são suficientes para ocasionar mudanças nas funções celulares, podendo alterar os padrões de expressão de genes de virulência ou os níveis de transferência de resistência (KÜMMERER, 2009b).

A presença crônica destes antimicrobianos no processo de tratamento pode induzir à seleção de linhagens resistentes na

comunidade microbiana que, por sua vez, poderiam transferir horizontalmente esses genes de resistência para microrganismos patogênicos presentes no meio (BAQUERO, MARTINEZ e CANTON, 2008). Adicionalmente, antibióticos utilizados em diferentes etapas do processo produtivo seriam misturados durante o processo de tratamento favorecendo a ocorrência de sinergismos e a seleção de cepas multirresistentes. Cabe salientar que a introdução de cepas resistentes tem sido apontada como uma forma de promover o desenvolvimento de resistência no meio ambiente mais significativa que a presença de antibióticos nos efluentes (KÜMMERER, 2009b). Diversos patógenos podem estar presentes nos dejetos suínos, e dentre os mais importantes pode-se citar *E. coli* O157:H7, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Yersinia*, *Cryptosporidium* e *Giardia* (GUAN e HOLLEY, 2003).

Apesar de serem utilizadas doses sub-terapêuticas no uso como promotores de crescimento, comumente estas doses encontram-se acima das concentrações mínimas inibitórias para diversos patógenos, como pode ser observado na

Tabela 3, criando condições possivelmente favoráveis à seleção de cepas resistentes mesmo que apenas durante algumas etapas do processo digestivo (SOU, 1997). Segundo Berends (2001), o uso como aditivo alimentar poderia acarretar maiores impactos sobre o desenvolvimento de cepas resistentes que o uso estrito como agente terapêutico.

Desta forma, para a aplicação de um reciclo dos efluentes, torna-se imperativo o uso de sistemas eficientes de desinfecção para assegurar a sanidade e a biossegurança do processo. Alguns processos convencionais de desinfecção, como a cloração, têm demonstrado utilidade na remoção de fármacos residuais em efluentes de suinocultura (ADAMS, 2008).

3.2.3. Toxicidade de antibióticos sobre processos biológicos de tratamento de efluentes

Os mecanismos envolvidos na toxicidade de antibióticos sobre a microbiota presente nos sistemas de tratamento ainda são questões pouco esclarecidas, geralmente devido à complexidade da comunidade microbiana presente. No entanto, é consenso que a ação antimicrobiana

inibitória e/ou bactericida dos antibióticos pode afetar a comunidade microbiana podendo comprometer em alguns casos a eficiência na biodegradação dos poluentes (KÜMMERER, 2009a).

Tabela 3: Concentração Inibitória Mínima de diversos antibióticos para dois agentes patogênicos (*Clostridia* e *Enterococci*) e dosagens comumente utilizadas destes medicamentos quando utilizados como aditivos alimentares. Adaptado de SOU (1997).

	Faixa de concentração inibitória mínima (mg.L ⁻¹)		Dosagens utilizadas como aditivo alimentar (mg.L ⁻¹)
	Clostridia	Enterococci	
Avilamicina	<0,25-0,5	NA	2,5-40
Avoparcina	0,5-2	1-2	5-40
Bacitracina	<1-4 ²	<0,5-16 ²	5-100
Flavomicina	<1-8	0,25-4	1-25
Monensina	0,5-4	1-2	10-40
Espiramicina	0,25-8	0,5-4	5-80
Tilosina	<1	1-4	4-40
Virginiamicina	0,25-1	0,25-8	5-80

Os testes de toxicidade aguda comumente empregados, porém, não são suficientes para a determinação dos efeitos tóxicos de antibióticos sobre comunidades microbianas. A maioria dos antibióticos possui ação apenas inibitória e seus efeitos reais são mais perceptíveis em experimentos prolongados que envolvam o crescimento microbiano (toxicidade crônica). Testes de toxicidade com bactérias têm demonstrado que a exposição crônica aos antibióticos é comumente mais crítica que a exposição aguda, podendo ser observado na exposição crônica efeito tóxico em concentrações ambientalmente relevantes e que não apresentam qualquer efeito tóxico em testes de exposição aguda (KÜMMERER, 2009a). Na suinocultura, alguns antibióticos, como a colistina, são utilizados de forma contínua como aditivos alimentares, de modo que a avaliação da toxicidade aguda destes antibióticos não seria suficiente para avaliar a magnitude do impacto destes compostos a médio ou longo prazo.

Outra questão importante para obtenção de dados de toxicidade de antibióticos sobre sistemas microbiológicos refere-se ao uso de culturas puras (e.g. *Vibrio fischeri*) ou culturas mistas (e.g. lodo de estação de tratamento) como modelo experimental. Apesar de apresentar inúmeras vantagens, o uso de culturas puras apresenta algumas limitações importantes por avaliar a ação do antibiótico sobre um único tipo de microrganismo, representando, portanto, a sensibilidade apenas daquele microrganismo em relação ao antimicrobiano testado. Outra questão importante refere-se ao fato de que não é possível verificar com cepas puras a capacidade de adaptação dos sistemas microbianos naturais através de seleção de linhagens tolerantes, questão muito relevante especialmente quando se avalia seus potenciais impactos sobre unidades de tratamento biológico. Além disso, os antibióticos comumente apresentam ação seletiva ou predominante sobre espécies gram-positivas ou gram-negativas, e o uso de uma espécie gram-positiva para avaliação da toxicidade de um antibiótico seletivo sobre gram-negativas não seria apropriado para inferir sobre os seus efeitos nas comunidades microbianas, e vice-versa. O uso de culturas mistas, por outro lado, apresenta a limitação de poder mascarar os efeitos tóxicos dos compostos sobre espécies sensíveis com o crescimento de espécies não afetadas devido à redução da competição e ao aumento da quantidade de substrato disponível para aquele grupo (KÜMMERER, 2009a).

Nos sistemas anaeróbios, o grupo de microrganismos que apresenta maior sensibilidade à presença de antibióticos é o das arqueas metanogênicas acetoclásticas. Diversos antibióticos demonstram inibição sobre a metanogênese, estando a inibição diretamente relacionada com a capacidade de adsorção dos antibióticos sobre a biomassa anaeróbia (KÜMMERER, 2009a). Loftin *et al.* (2005) analisaram o efeito de antibióticos sobre a degradação anaeróbia em lagoas encontrando inibição com todos os antibióticos testados (sulfonamidas, tetraciclina, lincomicina e tilosina).

Nos sistemas de tratamento aeróbio um grupo de organismos particularmente sensível é o das bactérias nitrificantes. No entanto, a composição microbiológica da biomassa nitrificante, em geral, pode ser um fator determinante para a amplitude dos efeitos dos antibióticos sobre o processo. Louvet *et al.* (2010), ao testar os efeitos da eritromicina sobre a nitrificação utilizando como inóculo biomassas provenientes de diferentes estações de tratamento de esgoto urbano,

encontraram variação nos efeitos do antibiótico em função da origem do inóculo, havendo até mesmo efeito positivo sobre a nitrificação em um dos lodos testados. Em um trabalho onde foi avaliado o efeito inibitório de sete diferentes compostos antimicrobianos sobre a atividade das BON, foi encontrado inibição significativa para a ofloxacina e o sulfametoxazol. No mesmo estudo também o triclosan ocasionou uma inibição substancial das BON (DOKIANAKIS, KORNAROS e LYBERATOS, 2004). Campos et al. (2001) avaliaram a influência de dois antibióticos de largo-espectro (cloranfenicol e oxitetraciclina) sobre a atividade de um biofilme nitrificante em um reator de bancada. O cloranfenicol não apresentou praticamente qualquer efeito inibitório e a oxitetraciclina apresentou alguma inibição somente com concentrações superiores a 100 mg.L^{-1} . Toth *et al.* (2011) demonstraram que concentrações ambientalmente relevantes de alguns antibióticos são suficientes para ocasionar inibição sobre os processos biológicos de redução do ferro e de nitrificação no solo.

Até o momento ainda são desconhecidos os efeitos de toxicidade da colistina sobre as bactérias nitrificantes e seus potenciais impactos sobre processos de remoção biológica de nitrogênio, bem como sobre outros processos biológicos relacionados ao tratamento de efluentes, como a metanogênese, por exemplo.

3.2.4. Remoção dos antibióticos em estações de tratamento

A remoção dos antibióticos nos sistemas de tratamento ocorre por diferentes mecanismos, incluindo processos físico-químicos, como adsorção e hidrólise, bem como processos biológicos. Na sua maioria, os antibióticos são removidos por processos físicos de adsorção aos biosólidos, de modo que são muitas vezes encontrados em concentrações elevadas no lodo de descarte das estações de tratamento e nos sedimentos de lagoas (ADAMS, 2008).

Os mecanismos de remoção e degradação variam em função do tipo de antimicrobiano. As sulfonamidas e lincosamidas são compostos relativamente recalcitrantes, adsorvendo fracamente à fração sólida. A tilosina e as tetraciclinas, por outro lado, adsorvem mais fortemente aos sólidos e são degradadas mais rapidamente que as sulfonamidas. A

remoção biológica é limitada a alguns antibióticos menos recalcitrantes, estando diretamente relacionada com sua estrutura (ADAMS, 2008).

Ainda há pouca informação disponível sobre a biodegradação dos diferentes fármacos nos ambientes aeróbios, mas trabalhos como o de Ingerslev *et al.* (2001) sugerem que os antibióticos sofrem biodegradação maior nos sistemas aeróbios que nos anaeróbios. Nestes sistemas, aparentemente a biodegradação dos antibióticos e outros xenobióticos ocorre predominantemente pela ação das BOA. Isso ocorre devido à baixa especificidade da enzima AMO (amônia monooxigenase) pelo substrato, permitindo a co-oxidação de diversos hidrocarbonetos e até mesmo xenobióticos como alguns antibióticos (BOCK e WAGNER, 2006; KIM *et al.*, 2008).

Para verificar a estabilidade de diversos antimicrobianos em um sistema de lagoa, Loftin *et al.* (2008) verificaram o grau de hidrólise de diferentes antimicrobianos em água deionizada e efluente de lagoa anaeróbia filtrado, sob diferentes valores de pH. Os resultados demonstraram que a lincomicina, a trimetoprima, a sulfadimetoxina, o sulfatiazol, a sulfaclorpiridazina e a tilosina são recalcitrantes à hidrólise. Por outro lado, as tetraciclina, oxitetraciclina e clorotetraciclina são rapidamente hidrolisadas nas condições anaeróbias da lagoa (pH 5, 7 e 9).

3.3. Colistina (Polimixina E)

O termo colistina representa um grupo diverso de polimixinas E que apresenta como principais componentes as colistinas A e B (polimixinas E1 e E2, respectivamente). As polimixinas, dentre elas as polimixinas E, representam um grupo de antibióticos polipeptídicos cíclicos de caráter básico isolados da bactéria *Bacillus polymyxa* var. *colistinus* (Figura 2). Estão formadas por um polipeptídeo cíclico ao qual se liga uma cadeia lipídica variável entre as diferentes colistinas. A colistina é estruturalmente e farmacologicamente relacionada à polimixina B, outra forma comercialmente disponível de polimixina que difere da colistina por um único aminoácido no anel da cadeia peptídica (SARKAR, DESANTIS e KUPER, 2007).

Atuam como detergentes catiônicos e possuem ação específica sobre muitas bactérias gram-negativas, incluindo *Enterobacter aerogenes*, *E. coli*, *Haemophilus influenza*, *Bordetella pertussis*, *Legionella pneumophila*, espécies de *Salmonella*, espécies de *Shigella*, *K. pneumoniae*, e *P. aeruginosa* (SARKAR, DESANTIS e KUPER, 2007). A *E. coli* encontra-se entre os microrganismos mais sensíveis à colistina, com uma CI-50 de 0,1 mg/L (EMEA, 2002).

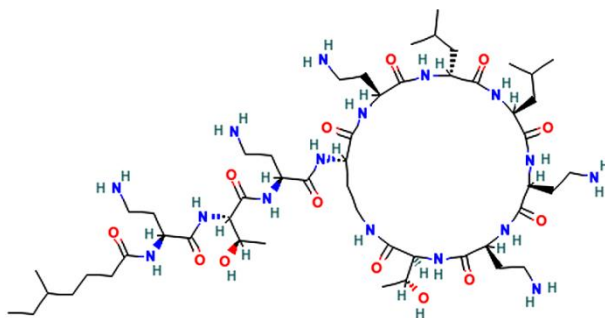


Figura 2: Estrutura molecular da colistina (PubChem – CID 5311054).

A atividade e seletividade dos peptídeos catiônicos são determinadas pelo seu modo de interação com a membrana celular. Em bactérias gram-negativas, este mecanismo envolve inicialmente a passagem pela barreira externa de lipopolissacarídeos (LPS) da membrana externa para então, no espaço periplasmático, entrar em contato com a membrana plasmática onde age desestruturando a mesma, resultando no extravazamento dos constituintes celulares e, consequentemente, na morte da célula. A ultrapassagem da barreira de LPS ocorre através de um processo que envolve inicialmente a interação do peptídeo com os sítios de ligação dos cátions divalentes (Ca^{2+} e Mg^{2+}) na membrana externa. Como os peptídeos possuem uma afinidade pelos sítios de ligação superior aos cátions divalentes, ocorre um deslocamento destes íons dos seus sítios de ligação. Como resultado, devido ao seu tamanho volumoso, acaba por desestabilizar a barreira de LPS permitindo então a passagem de diversos compostos para o espaço periplasmático, e dentre eles o próprio peptídeo. Este mecanismo de

desestabilização estrutural da membrana externa, permitindo a passagem de diversos compostos para o espaço periplasmático, explica em parte por que este tipo de antibiótico costuma apresentar fortes efeitos sinérgicos com outros antimicrobianos (HANCOCK, 1997). Uma vez no espaço periplasmático o antibiótico carregado positivamente interage com a membrana carregada negativamente resultando na criação de canais na membrana celular, o que compromete a integridade da membrana levando à morte celular pela perda de constituintes celulares. Além da composição, a conformação tridimensional é um fator fundamental para a ação da colistina, uma vez que a sua forma enantiomérica é completamente inativa (VAARA, 2009).

A colistina já é conhecida há mais de 50 anos e atualmente tem sido resgatado o seu uso também na medicina humana como opção para o tratamento de cepas multiresistentes de bactérias gram-negativas como *P. aeruginosa*, *A. baumannii* e *K. pneumoniae* (NASNAS, SALIBA e HALLAK, 2009). Atualmente, a ocorrência de resistência à colistina é relativamente rara, no entanto, bactérias resistentes à colistina têm sido descritas e diversos mecanismos moleculares de resistência têm sido caracterizados em patógenos gram-negativos. Os principais mecanismos de resistência à colistina envolvem modificações na composição da camada de LPS, de modo a reduzir a quantidade de LPS aniônicos dificultando então a sua ligação à membrana e impedindo sua passagem para o espaço periplasmático (NATION e LI, 2009). Foi demonstrado, porém, que este mecanismo que confere resistência à colistina aumenta a permeabilidade da membrana externa a outros compostos, aumentando a susceptibilidade da célula a diversos outros antibióticos. Devido a isso, atualmente, muitas das estratégias propostas para o tratamento de cepas multirresistentes propõe o uso da colistina associado a algum outro antibiótico, que teria como função destruir as cepas resistentes à colistina (LI *et al.*, 2007; VAARA, 2009).

O fato de a colistina apresentar ação seletiva sobre bactérias gram-negativas, diferentemente da grande maioria dos outros antimicrobianos utilizados na alimentação animal, desperta a atenção para a possibilidade de efeitos adversos sobre a nitrificação e outros sistemas dependentes de organismos gram-negativos nas estações de tratamento. Apesar de a colistina ser um antibiótico já bastante antigo na medicina, dados a respeito da sua farmacologia e das suas propriedades microbiológicas são muito escassos (NATION e LI, 2009).

A colistina é utilizada comercialmente sob duas formulações: sulfato de colistina, usado na formulação de medicamentos para uso oral, e colistina metanosulfonato, que é utilizada para aplicações por via parental. Na suinocultura é utilizada como aditivo alimentar e terapeuticamente, constituindo um dos antibióticos mais potentes para o tratamento de infecções ocasionadas por cepas de *E. coli* (enterocolites). Como terapêutico é empregada na suinocultura principalmente para o tratamento de infecções ocasionadas por *P. aeruginosa*, *E. coli* e *Salmonella* sp..

Acredita-se que a sua atuação como promotor de crescimento ocorra predominantemente sobre a microbiota intestinal. A sua ação seletiva sobre gram-negativas impediria o desenvolvimento da maioria das bactérias enteropatogênicas permitindo o crescimento das bactérias benéficas ao bom funcionamento do sistema digestivo. Quando administrada oralmente é muito fracamente absorvida pelo trato intestinal, sendo na sua quase totalidade eliminada com as fezes de forma inalterada (EMEA, 2002; SARKAR, DESANTIS e KUPER, 2007).

A estabilidade e toxicidade da colistina nos processos de tratamento biológico ainda são praticamente desconhecidos. Li *et al.* (2003) estudaram a estabilidade das colistinas A e B em três diferentes matrizes, sendo elas água, tampão fosfato isotônico ($0,067 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 7,4) e plasma humano. A colistina apresentou grande estabilidade na água, porém, com uma degradação pronunciada, especialmente da colistina A, no tampão fosfato e no plasma. Segundo os autores, a degradação maior no tampão e no plasma pode ocorrer devido ao pH mais elevado nestas matrizes do que na água (pH 5,63 – 5,98).

3.4. Biologia da nitrificação

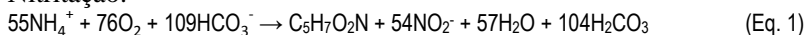
O nitrogênio pode ser eliminado dos efluentes através de uma série de processos físico-químicos e biológicos. Os processos biológicos, porém, em função de sua alta eficiência e baixo custo têm sido normalmente utilizados em detrimento dos métodos físico-químicos. O nitrogênio encontra-se nas águas residuárias normalmente sob a forma de nitrogênio amoniacal, que se origina em geral da

degradação dos compostos orgânicos nitrogenados, principalmente proteínas e uréia, através de processos aeróbios e/ou anaeróbios.

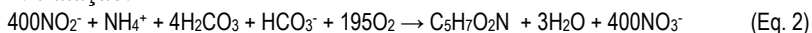
Comumente, a remoção do nitrogênio nos sistemas de tratamento tem sido feita através de processos de nitrificação/desnitrificação clássica, onde o nitrogênio amoniacal é inicialmente oxidado a nitrato pela ação das bactérias nitrificantes, e posteriormente convertido a nitrogênio gasoso como resultado da respiração heterotrófica e anaeróbia do nitrato pelas bactérias desnitrificantes.

A nitrificação é um processo quimiolitoautotrófico estritamente aeróbio, ocorrendo em duas etapas consecutivas que são realizadas por microrganismos distintos: as BOA, responsáveis pela oxidação do nitrogênio amoniacal a nitrito na nitrificação (Eq. 1) e as BON, responsáveis pela oxidação do nitrito a nitrato na nitratação (Eq. 2). A nitrificação é realizada essencialmente pelas bactérias do gênero *Nitrosomonas*, no entanto, pode ser também realizada por outras espécies de proteobactérias dos gêneros *Nitrospira*, *Nitrosococcus*, *Nitrosovibrio* e *Nitrosolobus*. Já na nitratação, as principais espécies envolvidas no processo em reatores de tratamento biológico pertencem aos gêneros *Nitrobacter* e, em muitos casos, *Nitrospira*. Trabalhos recentes utilizando sondas oligonucleotídicas para 16S rRNA demonstraram que na maioria dos casos não é o gênero *Nitrobacter* que domina nos reatores, mas sim o gênero *Nitrospira*. Além destas, são também capazes de realizar a oxidação do nitrito a nitrato espécies dos gêneros *Nitrospina*, *Nitrococcus* e *Nitrocystis* (RITTMANN e MCCARTY, 2001). A nitrificação pode ser teoricamente expressa pela combinação das equações 1 e 2, tendo como resultado a equação 3 (BERNET e SPÉRANDIO, 2009):

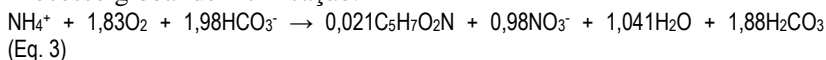
Nitrificação:



Nitratação:



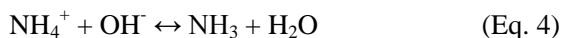
Processo global de nitrificação:



De acordo com estas equações, o rendimento de biomassa para a oxidação da amônia é maior que o observado para a oxidação do nitrito, sendo aproximadamente 0,15 mg de células / mg N-NAT (nitrogênio amoniacal total) oxidado e 0,02 mg de células / mg N-NO₂⁻ oxidado, respectivamente. O consumo de oxigênio estimado é de 3,16 mg O₂ / mg N-NAT oxidado, e 1,11 mg O₂ / mg N-NO₂⁻ oxidado, totalizando 4,27 mg O₂ / mg N-NAT oxidado a nitrato. Também pode ser estimado a partir das equações apresentadas acima que o consumo de alcalinidade é de 7,07 mg CaCO₃ / mg N-NAT oxidado, ocorrendo consumo de alcalinidade apenas para a etapa de nitrificação. O esgotamento da alcalinidade pela oxidação do nitrogênio amoniacal acarreta quedas bruscas no pH, causando redução rápida nas velocidades de reação em valores de pH abaixo de 7,0, muitas vezes inibindo o processo de nitrificação.

Devido à baixa velocidade de crescimento específico, as bactérias nitrificantes necessitam de tempos de retenção de sólidos longos nos reatores, tipicamente superiores a 15 dias, podendo necessitar de tempos ainda maiores na presença de compostos tóxicos, baixa concentração de oxigênio ou temperatura baixa, por exemplo. Nitrificantes são sensíveis à inibição por uma série de compostos orgânicos e inorgânicos. Dentre os mais relevantes pode-se citar a amônia livre (NH₃), o ácido nitroso (HNO₂), surfactantes aniônicos, metais pesados e compostos organoclorados (RITTMANN e MCCARTY, 2001).

Um fator importante na determinação da velocidade de nitrificação é o pH. Em meio aquoso, existe um equilíbrio entre a amônia e a sua forma iônica (íon amônio) (Eq. 4), sendo que a distribuição das formas neste equilíbrio está diretamente relacionado com o pH.



Em pH neutro ou ácido, a maior parte do nitrogênio amoniacal encontra-se sob a forma ionizada (NH₄⁺), no entanto, à medida que o pH se eleva o equilíbrio é deslocado para a forma livre e citotóxica (NH₃) que é facilmente perdida para a atmosfera em valores mais elevados de pH (BITTON, 2005; SCHMIDELL NETO e REGINATTO, 2007) (Figura 3). A amônia livre (NH₃), apesar de ser a forma citotóxica, aparentemente é a única forma que a célula consegue utilizar como

substrato (VAN HULLE *et al.*, 2007), de modo que quantidades excessivamente altas ou baixas de amônia livre são ambas prejudiciais para a nitrificação.

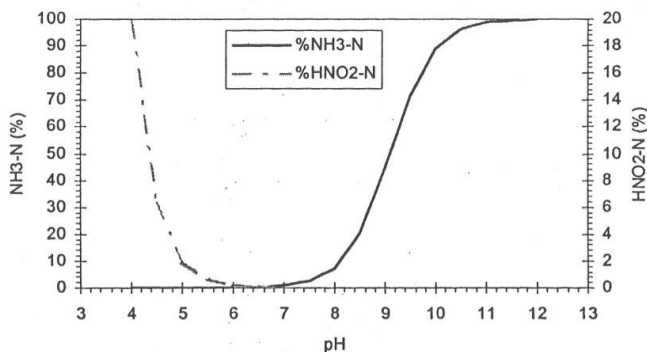


Figura 3: Porcentagem de amônia livre como N (em relação ao total de N presente) e porcentagem de ácido nitroso como N (em relação à quantidade de nitrito presente) para 30 °C (SCHMIDELL NETO e REGINATTO, 2007).

A temperatura também é um fator importante para a nitrificação. Aumentos de temperatura proporcionam aumentos da velocidade de crescimento específico de forma aproximadamente similar tanto para as BOA como para as BON. A diferença, porém, torna-se grande em relação à variação observada no valor da constante de saturação (K_S) em função da temperatura, sendo mais intensos os efeitos sobre as BON, que apresentam uma elevação bem mais acentuada nos valores de K_S com o aumento da temperatura, que a observada para as BOA (RITTMANN e MCCARTY, 2001).

Uma variação do processo clássico de nitrificação e desnitrificação é o processo SHARON (*Single Reactor High Activity Ammonium Removal over Nitrite*), onde busca-se evitar a etapa de conversão do nitrito a nitrato permitindo a desnitrificação diretamente a partir do nitrito. Neste caso, buscam-se condições de cultivo que promovam a inibição seletiva das BON, evitando a conversão do nitrito a nitrato. A interrupção da nitrificação em nível do nitrito (nitrificação parcial) reduz significativamente o consumo de oxigênio no processo. Da mesma forma, a conversão direta do nitrito a N_2 sem a necessidade da desnitratação prévia contribui em alguns casos para a redução de

custos do processo por reduzir o consumo de carbono em comparação ao método clássico nitrificação/desnitrificação. O processo de nitrificação parcial e desnitrificação permite uma economia de 25% de oxigênio, representando geralmente uma economia de energia elétrica, e 40% de carbono orgânico em comparação ao sistema clássico de nitrificação e desnitrificação, resultando também em menor formação de lodo (PAREDES *et al.*, 2007).

Para possibilitar o estabelecimento deste processo deve-se evitar o desenvolvimento de BON no reator. Em elevadas temperaturas as BOA tendem a crescer mais rápido que as BON, sendo que aos 35 °C a taxa de crescimento máxima das BON chega a ser cerca da metade da taxa de crescimento das BOA. Nesta situação, a utilização de um processo sem retenção de lodo e com tempo de retenção hidráulica (TRH) adequado possibilita o impedimento do desenvolvimento das bactérias oxidadoras de nitrito pela lavagem seletiva das células. Fatores como concentração de oxigênio, pH, concentração e carga do substrato, dentre outros, são também utilizados para conseguir o desenvolvimento seletivo das *Nitrosomonas*, principalmente *N. eutropha* (SCHMIDT *et al.*, 2003).

Zdradek (2005) propõe a utilização de aeração intermitente, alternando períodos aerados e períodos anóxicos como estratégia para inibição seletiva das BON em um sistema do tipo SBR. Esta estratégia foi utilizada neste trabalho para obtenção do processo de nitrificação parcial, necessário para produção de biomassa composta essencialmente de BOA, conforme descrito posteriormente.

3.5. Biologia dos sistemas anaeróbios de biodegradação da matéria orgânica e metanogênese

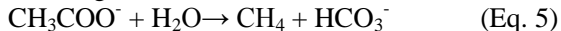
O processo de digestão anaeróbia ocorre na ausência de oxigênio e caracteriza-se por apresentar como produtos finais da decomposição da matéria orgânica o metano e o dióxido de carbono. Este processo envolve essencialmente duas etapas: uma etapa acidogênica de formação de ácido acético e H₂, seguida de outra etapa onde o ácido acético e o H₂ (utilizando o CO₂ como aceptor de elétrons) são convertidos a metano pelos microrganismos metanogênicos. A maioria das espécies metanogênicas desenvolve-se pela redução do

dióxido de carbono com hidrogênio, porém a maior parcela do metano formado nos digestores provém da lise do ácido acético (WHITMAN, BOWEN e BOONE, 2006; TABATABAEI *et al.*, 2010).

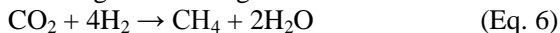
De uma forma geral, as bactérias acidogênicas estão relacionadas à degradação de celulose e outros carboidratos, proteínas, nucleotídeos e lipídeos em moléculas orgânicas mais simples, as quais são fermentadas a gás hidrogênio, dióxido de carbono, ácido acético e outros ácidos orgânicos, álcoois, sulfeto de hidrogênio, amônia, ácidos húmicos e fúlvicos. Os ácidos orgânicos e álcoois são convertidos, por sua vez, a ácido acético por bactérias acetogênicas, um subgrupo de bactérias acidogênicas (MADIGAN, MARTINKO e PARKER, 2004).

Na metanogênese, microrganismos pertencentes ao domínio Archaeae são capazes de converter em metano o ácido acético e o dióxido de carbono (este último reduzido pelo hidrogênio), além de outros substratos como o ácido fórmico, metanol e tri-, di- e monometilamina (SYKES, 2003). As equações abaixo ilustram as duas principais rotas de metanogênese utilizadas pelas arqueas (Eq. 5 e 6) (MADIGAN, MARTINKO e PARKER, 2004):

Metanogênese acetoclástica



Metanogênese hidrogenotrófica



Na ausência de oxigênio, algumas bactérias especializadas são capazes de respirar utilizando outros compostos inorgânicos como aceptores de elétrons. Bactérias redutoras de sulfato, ferro e nitrato/nitrito irão competir com as arqueas metanogênicas pelos substratos orgânicos e H_2 presentes. A composição relativa do substrato em relação a estes compostos inorgânicos irá determinar em grande parte a composição da comunidade microbiana anaeróbia (WHITMAN, BOWEN e BOONE, 2006).

Muitos dos microrganismos responsáveis pela digestão anaeróbia são microrganismos intestinais comuns, e a maioria estritamente anaeróbios, sendo facilmente destruídos na presença do oxigênio. Bactérias anaeróbias facultativas como os coliformes representam apenas uma fração bastante reduzida da população, podendo ser inferior a 1%. A análise da sequência 16S rRNA de

espécies encontradas no lodo revela a presença de vários táxons de procariontes, como o filo Proteobacteria (principalmente nas classes Delta-proteobacteria, Chloroflexi, Firmicutes, Spirochaetes e Bacteroidetes no domínio Bacteria). Dentre as arqueas, as classes Methanomicrobia, Methanobacteriae e Thermoplasmata são frequentemente encontradas. Todavia, mais de 20 filos diferentes de procariontes (maioria arqueas metanogênicas) foram detectados no lodo anaeróbio (NARIHIRO e SEKIGUCHI, 2007).

Os microrganismos envolvidos no processo apresentam temperatura ótima normalmente em torno de 35 °C e pH entre 6,5 e 7,5. A temperatura afeta principalmente as arqueas metanogênicas por apresentarem crescimento mais lento que as acidogênicas. A produção de metano é também fortemente influenciada pelo pH, somente ocorrendo sua produção entre os valores de pH 5 e 9, com valor ótimo em torno de 7 e decaindo rapidamente à medida que o pH aumenta ou diminui.

A digestão anaeróbia é um processo bastante atrativo, pois permite o aproveitamento de parte da energia obtida da degradação dos poluentes sob a forma de metano. Diversos tipos de efluentes agrícolas e industriais são boas opções para tratamento com estes processos, pois possuem grande quantidade de materiais facilmente biodegradáveis (CHEN, CHENG e CREAMER, 2007). A produção de metano é o principal benefício da decomposição anaeróbia, podendo ser utilizado como combustível em inúmeras aplicações. Digestores municipais típicos produzem um gás com composição média de 65% v/v de metano, 30% de dióxido de carbono, 2,6% de nitrogênio e quantidades menores de hidrogênio, monóxido de carbono, sulfeto de hidrogênio e outros compostos. A degradação de carboidratos e ácido acético produzem gases com concentração aproximada de 1:1 v/v de metano e dióxido de carbono. Proteínas e ácidos graxos de cadeia longa produzem gases com composição aproximada de 3:1 v/v de metano e dióxido de carbono. Para a utilização do gás, os aerossóis e o sulfeto de hidrogênio precisam ser removidos, o que limita em alguns casos a sua aplicação.

4. Materiais e Métodos

4.1. Reatores biológicos

Tendo em vista a produção de biomassa nitritante (BOA) e nitrificante (BOA+BON), foram construídos dois reatores para operação automatizada em modo de batelada sequencial (SBR), denominados reatores NTT (abreviação de “nitritante”) e NTF (abreviação de “nitrificante”), respectivamente. A estrutura utilizada para o reator NTF foi também utilizada para os experimentos de toxicidade crônica, com algumas modificações, conforme será descrito no item 4.1.3 (pg. 38) - neste caso denominado então reator NTF_{tox}.

4.1.1. Reator nitritante para produção de biomassa (reator NTT)

Para produção de biomassa nitritante (BOA) utilizou-se um reator cilíndrico com volume útil de 5 L, diâmetro de 18 cm e altura total de 30 cm (altura preenchida 20 cm), denominado reator NTT (Figura 4).

A agitação do reator foi obtida utilizando-se inicialmente um agitador de pás (marca FISATOM mod. 713) à velocidade de 100 rpm, porém, a partir do 507º dia de operação o reator passou a ser operado com agitação mediada apenas pela aeração. Não houve controle de temperatura e a aeração foi realizada com uso de bomba compressora de ar (marca BIG AIR, mod. A420) conectada por mangueira de silicone a uma pedra difusora. Foram utilizadas bombas peristálticas para alimentação do reator (marca DIST, mod. DI300) e descarte do efluente (marca MILAN, mod. BP-600).

O controle dos equipamentos (bomba de alimentação, bomba de descarte, agitador e aerador) foi automatizado através do uso de um controlador lógico programável (CLP) (marca DEXTER, mod. μ DX série 100), utilizando para o controle do CLP o software de programação gráfica PG v6.8 (DEXTER).

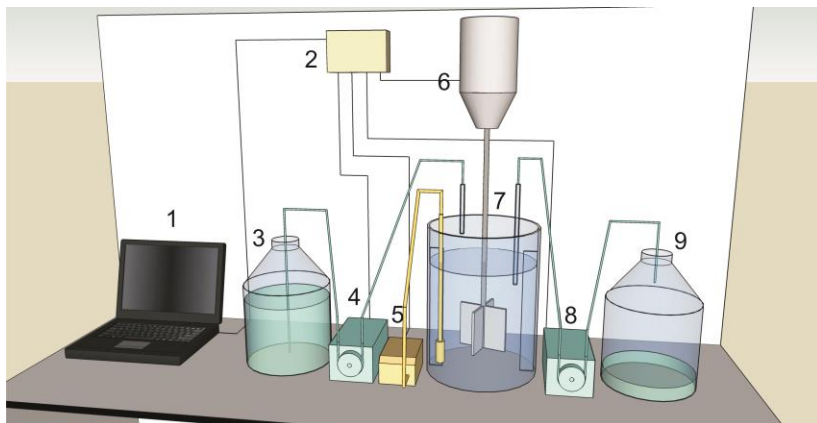


Figura 4: Esquema ilustrativo do reator em batelada sequencial (SBR – *Sequencing Batch Reactor*) nitritante, denominado reator NTT, utilizado para produção de bactérias oxidadoras de amônia (BOA). (1) computador, (2) controlador lógico programável (CLP), (3) meio de alimentação, (4) bomba peristáltica de alimentação, (5) bomba compressora de ar, (6) agitador de pás, (7) reator tipo SBR 5L, (8) bomba peristáltica de descarte, (9) efluente descartado.

4.1.1.1. Meio de Cultura

Os cultivos foram realizados com meio modificado de Tanaka et al. (1981) (Tabelas 4 e 5), o qual foi originalmente proposto para o cultivo de bactérias nitrificantes em reator de leito fixo. A principal modificação do meio refere-se ao aumento na concentração de nitrogênio para $1.000 \text{ mg N-NAT.L}^{-1}$ para aproximar-se mais dos valores de concentração de nitrogênio encontrados em efluentes da suinocultura (Tabela 01, p. 7). A concentração de outros nutrientes também foi aumentada para compensar o aumento na quantidade de nitrogênio a ser oxidado. A alcalinidade foi ajustada para fornecer apenas a quantidade estequiométrica necessária para oxidação da amônia, conforme equação 1 (p. 24).

Tabela 4: Composição do meio de cultura sintético adaptado de Tanaka (1981).

Nutrientes	g/L
NH ₄ Cl	1,9107
(NH ₄) ₂ SO ₄	2,3589
KH ₂ PO ₄	0,25
MgSO ₄	0,123
FeSO ₄	0,008
CaCl	0,008
NaHCO ₃	11,9616
Solução de micronutrientes	0,15 mL

Tabela 5: Composição da solução de micronutrientes (Tanaka, 1981).

Nutrientes	mg/L
ZnSO ₄	700
NaMoO ₂ .2H ₂ O	100
MnSO ₄	1.000
CuSO ₄ .7H ₂ O	50
CoCl ₂ .6H ₂ O	30
KI	100
KAl(SO ₄) ₂ .12H ₂ O	100
EDTA	975

4.1.1.2. Inóculo

Como inóculo para o reator NTT foi utilizada biomassa predominantemente nitritante proveniente de um reator tipo *air-lift* operado em condição de nitrificação parcial e com meio de cultura conforme descrito por Vanotti (2000) (também modificado a partir de Tanaka et al. (1981)). Este reator, por sua vez, havia sido inoculado com lodo ativado da Estação de Tratamento de Dejetos de Suínos (ETDS) da Embrapa Suínos e Aves (KUNZ, MIELE e STEINMETZ, 2009).

4.1.1.3. Operação do reator

Para forçar a aclimação da biomassa nitritante ao processo SBR e às condições de elevadas concentrações de amônia e nitrito no meio, condição muitas vezes encontrada no tratamento de dejetos de suínos, manteve-se inicialmente a biomassa em um reator de 1,5 L, denominado reator NTT_{parcial} (similar ao reator NTF apresentado na Figura 5), sob condição de nitrificação parcial (oxidação a nitrito de 50% do nitrogênio amoniacal) (Tabela 6), evitando-se assim os períodos de baixa concentração de amônia que ocorreriam aos finais dos ciclos caso a nitrificação fosse completa.

Tabela 6: Condições de cultivo para os reatores nitritantes (NTT_{parcial} e NTT).

	NTT_{parcial}	NTT
Processo objetivado	Nitrificação parcial	Nitrificação parcial (nitrificação)
Volume Reator	1,5 L	5 L
Vol. Troca / ciclo	33,3% (0,5 L)	20% (1 L)
Duração do ciclo	dias 1-60: 12 h dias 61-105: 8 h	12 h
[N-NAT] meio de cultura	1000 mg N-NAT.L ⁻¹	1000 mg N-NAT.L ⁻¹
Carga volumétrica de NA	dias 1 a 60: 667 mg N-NAT.L ⁻¹ .d ⁻¹ dias 61 a 106: 1000 mg N-NAT.L ⁻¹ .d ⁻¹	400 mg N-NAT.L ⁻¹ .d ⁻¹
TRH (Tempo de retenção hidráulica)	dias 1 a 60: 1,5 d dias 61 a 106: 1 d	2,5 d
Alcalinidade disponível*	50%	100%
Padrão de aeração	Intermitente (15 min aerado / 45 min sem aeração)	Intermitente (15 min aerado / 45 min sem aeração)

* Percentual de alcalinidade em relação ao total necessário para oxidar o NA disponível conforme estequiometria apresentada na equação 1.

Para auxiliar no controle da fração de amônia oxidada durante este período de enriquecimento do inóculo, utilizou-se apenas a metade da alcalinidade carbonácea necessária para neutralizar a acidez oriunda da oxidação da amônia, tendo como base a relação estequiométrica proposta na equação 1. O término da alcalinidade promove uma rápida

queda no pH, reduzindo drasticamente a nitrificação principalmente pela indisponibilidade de substrato para as BOA, que tem o seu substrato (amônia livre) quase totalmente deslocado para íon amônio em função da redução do pH. Após a transferência para o reator definitivo NTT o meio de cultura foi modificado para conter 100% da alcalinidade prevista pela estequiometria da reação.

A aeração intermitente, com 15 minutos de aeração para cada 45 minutos não aerados, foi utilizada como principal recurso para inibição das BON e manutenção da oxidação parcial do nitrogênio amoniacal a nitrito (ZDRADEK, 2005). Desta forma, simplificarmente, pode-se dizer que a conversão a nitrato era inibida pela adoção do padrão de aeração intermitente e o controle da fração de amônia oxidada a nitrito era facilitado pela manipulação da quantidade de alcalinidade disponível para o processo.

No período inicial de enriquecimento (reator NTT_{parcial}), a alimentação foi fornecida em uma única etapa no início do ciclo, sendo operado até o 60º dia de operação do reator com períodos de reação de 11 horas (total de 12 horas / ciclo), e após este dia com período de reação / ciclo reduzido para sete horas (total de 8 horas / ciclo). Em ambos os casos, após o período de reação o reator era desligado por uma hora para sedimentação da biomassa (40 min), descarte do efluente tratado (10 min) e realimentação do reator (10 min).

Após a transferência da biomassa para o reator NTT definitivo passou-se a operar novamente com ciclos de 12 h. Porém, para otimizar a atuação do sistema de tamponamento com bicarbonato, optou-se pela distribuição da alimentação em etapas, sendo a alimentação de cada ciclo subdividida em 6 etapas de alimentação adicionadas logo antes das 6 primeiras aerações. O fornecimento da alcalinidade ao sistema de forma gradual e não em uma única etapa reduz a perda da alcalinidade do sistema carbonato com o arraste do CO₂ pela aeração nas fases iniciais dos ciclos, quando a concentração estaria mais elevada. A alcalinidade em carbonato-bicarbonato que se perde desta forma é substituída por alcalinidade em hidróxido com consequente elevação do pH. Considerando que o início do ciclo seria o momento que apresentaria as maiores concentrações de nitrogênio amoniacal em caso de alimentação em única etapa, eventualmente em níveis com forte potencial inibitório, uma subida excessiva de pH neste momento poderia colocar o sistema em uma condição de inibição.

Visando a estabilidade e manutenção da inibição sobre as BON, e tendo em vista que o objetivo essencial deste reator era a produção de biomassa de BOA sob condições de carga relativamente elevadas, a operação do reator foi conduzida de forma a evitar o consumo total do nitrogênio amoniacal durante cada ciclo, bem como quedas excessivas de pH ao final do ciclo. A queda excessiva do pH nas fases finais do ciclo e/ou a falta de nitrogênio amoniacal acabam por resultar no aumento das concentrações de oxigênio dissolvido nas horas finais do ciclo, mantendo o oxigênio dissolvido (OD) elevado por tempo maior que o previsto pelo padrão de aeração e permitindo o desenvolvimento das BON durante estes momentos.

Não houve controle da idade do lodo, sendo removido somente o volume de biomassa necessário para os experimentos ou então ocasionalmente quando foi necessária alguma remoção de biomassa para controle da nitrificação parcial.

4.1.2. Reator nitrificante para produção de biomassa (reator NTF)

O reator NTF, utilizado para produção de biomassa nitrificante (BOA+BON) (Figura 5), difere estruturalmente do reator NTT essencialmente pelo menor volume (1,5 L de volume útil, com diâmetro de 12,5 cm e altura total de 19,5 cm) e utilização de um agitador magnético (marca FISATOM mod. 752A) ao invés do sistema de pás do reator NTT. De modo similar ao adotado para o reator NTT, utilizaram-se bombas peristálticas para alimentação e descarte (marca MILAN, modelos BP-200 e BP-600, respectivamente) e bomba compressora de ar para aeração (marca BIG AIR mod. A420), sendo o controle dos equipamentos também realizado com auxílio de um CLP (marca DEXTER, mod. μ DX série 100).

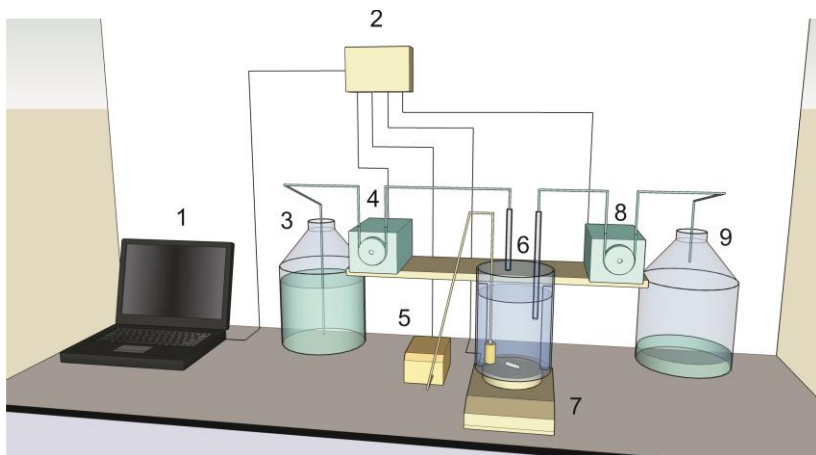


Figura 5: Esquema ilustrativo do reator em batelada sequencial (SBR – *Sequencing Batch Reactor*) utilizado para produção de biomassa nitrificante. (1) computador, (2) controlador lógico programável, (3) meio de alimentação, (4) bomba peristáltica de alimentação, (5) bomba compressora de ar, (6) reator tipo SBR 1,5L, (7) agitador magnético, (8) bomba peristáltica de descarte, (9) efluente descartado.

4.1.2.1. Meio de Cultura

Utilizou-se o mesmo meio de cultura empregado no reator NTT, conforme descrito no item 4.1.1.1 (p. 32).

4.1.2.2. Inóculo

Para o reator NTF, operado por períodos menores e com nova reinoculação e partida do reator a cada retirada de biomassa para os experimentos de toxicidade aguda, utilizou-se biomassa proveniente do reator NTT, que sob aeração contínua promovia a reativação e crescimento do grupo das BON estabelecendo a nitrificação completa.

A cada reinoculação, o reator era preenchido com 10% do seu volume útil com lodo sedimentado proveniente do reator NTT.

4.1.2.3. Operação do reator

A diferença significativa entre os reatores NTT e NTF reside no modo de operação dos reatores em relação ao padrão de aeração. No reator NTF, como o objetivo era a nitrificação completa, utilizou-se aeração contínua durante a fase de reação do reator.

O ciclo de operação utilizado para nitrificação completa consistia de um período de 7 horas de aeração contínua e 1 hora para as etapas de sedimentação, descarte do efluente e alimentação do reator (Tabela 7).

Tabela 7: Condições de cultivo para os reatores NTF.

NTF	
Processo objetivado	Nitrificação completa
Volume Reator (L)	1,5 L
Vol. Troca / ciclo	20% (300 mL)
Duração do ciclo	8 h
N-NAT meio de cultura	1000 mg N-NAT.L ⁻¹
Carga volumétrica	600 mg N-NAT.L ⁻¹ .d ⁻¹
Tempo de aeração	7 h
TRH	1,7 d
Padrão de aeração	Contínua

4.1.3. Reator nitrificante para experimento de toxicidade crônica (NTF_{tox})

Para os testes de toxicidade crônica sobre a nitrificação foi utilizado o mesmo reator NTF utilizado para produção de células (item 4.1.2), porém acrescido de um sistema de controle de pH. Foi utilizado para monitoramento e controle do pH um controlador de pH TH-44 (Digimed), utilizando somente solução de NaOH para evitar a queda do pH ocasionada pela nitrificação.

4.1.3.1. Meio de Cultura

O mesmo meio descrito no item 4.1.1.1 (p. 32) foi utilizado nesta etapa, porém sem adição de alcalinidade (bicarbonato). Deste modo, o CO_2 necessário para o crescimento celular era fornecido somente pela aeração.

4.1.3.2. Inóculo

Assim como para produção de biomassa nitrificante, utilizou-se para os testes de toxicidade crônica biomassa proveniente do reator NTT.

4.1.3.3. Operação do reator

O reator foi operado com volume útil de 1,8 L para os testes de toxicidade crônica, com volume de troca de 22% a cada ciclo de 8h (Tabela 8).

Tabela 8: Condições de cultivo para o reator NTF_{tox} durante experimento de toxicidade crônica.

	NTF_{tox}
Processo biológico objetivado	Nitrificação completa
Volume Reator (L)	1,8 L
Vol. Troca / ciclo	22% (400 mL)
Duração do ciclo (tempo reação)	8 h
[N-NAT] meio de cultura	1000 mg N-NAT.L ⁻¹
Carga volumétrica	667 mgN-NAT.L ⁻¹ .d ⁻¹
Tempo de aeração/ciclo	7 h
TRH	1,5 d
pH	7,5
Padrão de aeração	Contínua

4.1.4. Reator anaeróbio UASB

Foi utilizado reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo (reator tipo UASB – *Upflow Anaerobic Sludge Blanket*) com volume útil de 6 L e saída de gases conectada a um gasômetro de cúpula flutuante para aferição do volume diário de gás produzido. O reator possui formato cilíndrico com 10 cm de diâmetro e 85 cm de altura total. A alimentação do reator foi feita com o auxílio de uma bomba peristáltica (marca MASTERFLEX, modelo 7550-62) (Figura 6).

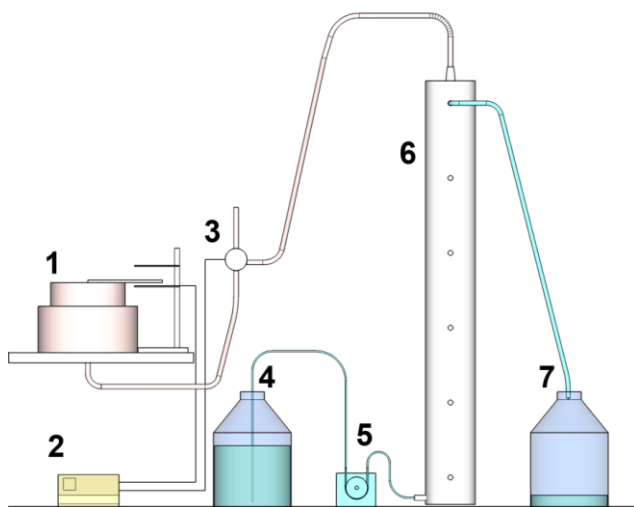


Figura 6: Esquema ilustrativo do reator anaeróbio de fluxo ascendente (UASB – *Upflow Anaerobic Sludge Blanket*) utilizado para testes de toxicidade crônica de antimicrobianos e produção de biomassa para testes de toxicidade aguda. (1) gasômetro de cúpula flutuante, (2) contador de ciclos, (3) válvula solenóide, (4) meio de alimentação, (5) bomba peristáltica alimentação, (6) reator tipo UASB 6 L, (7) descarte efluente.

Para manter a estabilidade da temperatura envolveu-se o reator com uma mangueira disposta de forma helicoidal ao longo do eixo do mesmo, através da qual era bombeada água de um banho termostatzado. Todavia, nos períodos mais frios do ano este procedimento não foi suficiente para manter estável a temperatura do

reator, de modo que foi necessário adicionar sobre a helicóide de mangueira que revestia o reator uma manta de isolamento térmico para forçar a troca de temperatura da mangueira com o reator e não com o ar do ambiente.

4.1.4.1. Meio de cultura e inóculo

Foi utilizado meio mineral contendo unicamente acetato como fonte de carbono (Tabela 9 e 10). A partida do reator foi realizada com biomassa do mesmo reator que, anteriormente, encontrava-se em operação utilizando dejetos de suíno como substrato.

Tabela 9: Meio de cultura reator anaeróbio (para DQO final de 1g/L), sendo que a concentração de DQO foi aumentada gradativamente sempre que o reator estabilizava a fração de remoção de DQO.

Nutrientes	Concentração (g.L ⁻¹)
CH ₃ COONa	Variável em função da carga
NH ₄ Cl	2,27
KH ₂ PO ₄	0,5
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,15
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,1
Solução micronutrientes	2 mL.L ⁻¹

Tabela 10: Composição da solução de micronutrientes.

Nutrientes	Concentração (mg.L ⁻¹)
FeCl ₃ .4H ₂ O	2000
CoCl ₂	1088
MnCl ₂ .4H ₂ O	500
CuSO ₄ .5H ₂ O	38
ZnSO ₄ .7H ₂ O	106
H ₃ BO ₃	50
(NH ₄) ₆ MoO ₇ .4H ₂ O	90
Na ₂ SeO ₃ .5H ₂ O	100
NiCl ₂ .6H ₂ O	50
EDTA	1000
HCl 36%	1 mL/L

4.1.4.2. Operação do reator

Para partida do reator foi utilizada inicialmente uma carga orgânica volumétrica de 1100 mg DQO.L⁻¹.d⁻¹ uma vez que a biomassa encontrava-se por um período prolongado sem atividade, sendo feita uma progressão de carga até atingir uma concentração de 5400 mg DQO.L⁻¹, resultando em uma carga orgânica volumétrica de 4500 mg DQO.L⁻¹.d⁻¹ (Tabela 11).

Tabela 11: Condições operacionais empregadas no reator UASB.

Fase	DQO meio (mg DQO.L ⁻¹)	Vazão (L.d ⁻¹)	Carga orgânica volumétrica (mg DQO.L ⁻¹ .d ⁻¹)	Incremento (%)
I	2000	3,3	1100	-
II	2000	5	1667	51,5
III	3000	5	2500	50,0
IV	4000	5	3333	33,3
V	5400	5	4500	35,0

4.2. Determinações físico-químicas do meio e do efluente dos reatores

4.2.1. Íons nitrogenados: amônia, nitrito, nitrato

A determinação dos íons nitrogenados (amônio, nitrito e nitrato) foi realizada por meio de métodos colorimétricos utilizando espectrofotômetro HACH (modelo DR 2000 e DR 5000 UV-Vis).

Para determinação da concentração de NA utilizou-se o método de Nessler (VOGEL, 1981). Neste método, a amônia é detectada colorimetricamente monitorando-se a formação de um precipitado de cor amarelo-pardacenta a partir da reação com o tetraiodomercurato do reagente de Nessler (solução alcalina de K₂(HgI₄)). Este precipitado encontra-se sob a forma coloidal logo após a sua formação, quando deve

ser quantificado no espectrofotômetro a 525 nm, em seguida flocula e sedimenta.

A determinação do nitrito foi realizada utilizando-se kits analíticos Nitriver 2 (marca HACH). Neste método o nitrito é reduzido pelo sulfato ferroso em meio ácido produzindo óxido nitroso, os quais reagem com o cádmio dando origem a um cromógeno que permite sua quantificação por colorimetria a 585 nm.

As concentrações de nitrato foram determinadas utilizando-se o método do ácido salicílico (CATALDO *et al.*, 1975), que consiste na complexação do ácido salicílico pelo íon nitrato em meio ácido e posterior quantificação pela absorbância a 410 nm.

4.2.2. Determinação da demanda química de oxigênio (DQO)

Para análise de DQO foram utilizados os procedimentos descritos no *Standard Methods for the examination of water and wastewater* (APHA, AWWA e WEF, 1995). Resumidamente, a DQO é determinada colorimetricamente pela oxidação da matéria orgânica com o dicromato de potássio em meio ácido, utilizando como catalisador o sulfato de prata. A quantificação é feita pela determinação colorimétrica do Cr^{3+} gerado pela redução do dicromato ao oxidar a matéria orgânica.

4.2.3. Determinação da série sólidos (SST, SSV e SSF)

A determinação de sólidos suspensos totais (SST), sólidos suspensos fixos (SSF) e sólidos suspensos voláteis (SSV) é realizada conforme procedimentos descritos pelo *Standard Methods for the examination of water and wastewater* (APHA, AWWA, WEF, 1995). Nos experimentos de toxicidade crônica a determinação dos sólidos suspensos totais foi realizada com o uso de forno micro-ondas, conforme descrito por (ZDRADEK, 2005).

4.3. Hibridização fluorescente in situ (FISH)

A composição genérica e a estrutura da biomassa foram avaliadas com auxílio da técnica de FISH (*Fluorescent in Situ Hybridization*). A técnica envolve a utilização de sondas específicas de DNA ligadas a fluoróforos - neste caso cianina 3 (Cy3) ligadas na extremidade 5' - que são hibridizadas, em geral, com o RNA ribossômico do organismo alvo. Após a hibridização, o material pode então ser visualizado em microscopia de epifluorescência ou microscopia confocal de varredura a laser. As sondas que foram utilizadas neste trabalho e as suas respectivas especificidades estão listadas na Tabela 12.

Tabela 12: Relação das sondas oligonucleotídicas que serão utilizadas neste trabalho para análise por FISH e respectivas especificidades. Referências conforme Nielsen et al. (2009).

Sonda	Especificidade	FA ¹ (%)	Referência
EUB mix EUB338 I EUB338 II EUB338 III	Eubacteria	20	Amann et al. (1990)
Nso190	β-proteobactérias oxidadoras de amônia	55	Mobarry et al. (1996)
NIT3	Gênero <i>Nitrobacter</i>	40	Wagner et al. (1996)
Amx820	<i>Candidatus Brocadia anammoxidans</i> <i>Candidatus Kuenenia stuttgartiensis</i>	40	Schimid et al. (2000)

¹ Percentual de formamida na hibridização

² Oligonucleotídeo competidor

A fixação da biomassa, imobilização das células na lâmina previamente tratadas com gelatina, desidratação e hibridização foram realizadas conforme protocolos adaptados a partir de Amann *et al.* (1990) ; e o preparo da lâmina foi feito de acordo com Amann *et al.* (1990b). Os protocolos encontram-se detalhados no Anexo 7.

A marcação da biomassa total foi realizada utilizando o fluoróforo DAPI (4'-6-diamidino-2-fenilindol), o qual se liga de forma inespecífica ao DNA permitindo a visualização da quantidade total de células presentes na amostra.

As amostras preparadas desta forma foram então visualizadas em microscopia de epifluorescência (OLYMPUS BX41) e microscopia confocal de varredura a laser (LEICA DMI6000 B).

4.4. Ensaios de toxicidade

4.4.1. Toxicidade sobre sistemas nitrificantes

O conjunto de ensaios elaborado para verificação da toxicidade da colistina sobre a nitrificação, foi concebido visando não apenas a obtenção de dados a respeito da toxicidade aguda destes antibióticos sobre as bactérias nitrificantes, mas especialmente dados a respeito da exposição crônica destes microrganismos à colistina, condição mais relevante no contexto do tratamento de efluentes.

Para a realização dos experimentos de toxicidade aguda sobre as BOA, utilizou-se colistina sob a forma de sulfato de colistina de duas procedências: uma formulação comercial (colistina_{com}) contendo 70% de lactose como veículo, e a colistina utilizada como matéria prima para formulação da colistina_{com} (colistina_{mp}), fornecida diretamente pela indústria fabricante da colistina_{com} e considerada para fins de cálculo como sendo 100% de sulfato de colistina. Em todos os demais experimentos (toxicidade aguda sobre as BON, toxicidade crônica sobre a nitrificação e toxicidade crônica sobre a metanogênese) foi utilizado somente a colistina_{mp}.

4.4.1.1. Toxicidade aguda sobre BOA e BON

Para a determinação da toxicidade aguda sobre as BOA e BON foram elaborados dois sistemas de experimentação em frascos agitados. Em ambos os sistemas foram utilizados frascos com volume útil de 250

mL, contendo diferentes concentrações de colistina. As diferenças entre os experimentos para toxicidade sobre as BOA e sobre as BON estão principalmente no inóculo utilizado e no substrato disponibilizado. Para obtenção de dados referentes à toxicidade aguda sobre as BOA utilizou-se biomassa nitrificante produzida no reator NTT e nitrogênio amoniacal como substrato. Já para a determinação da toxicidade sobre as BON utilizou-se biomassa nitrificante proveniente do reator NTF e unicamente NO_2^- como substrato.

A avaliação dos efeitos inibitórios sobre a nitratação juntamente com a nitritação é relativamente complexa em função da toxicidade sobre as BOA, que resultaria na modificação da disponibilidade de substrato para as oxidadoras de nitrito, dificultando a interpretação de resultados de toxicidade sobre este grupo. No entanto, é importante ressaltar que nos sistemas naturais esses dois processos ocorrem associados, sendo muito importante a compreensão do efeito dos antibióticos sobre os dois grupos simultaneamente. Por conta disso, optou-se pelo uso de nitrito como substrato para os testes de toxicidade aguda, permitindo observar os efeitos inibitórios isoladamente neste grupo, e nitrogênio amoniacal como substrato para os testes de toxicidade crônica sobre o sistema nitrificante como um todo (reator NTF_{tox}).

Os frascos, contendo diferentes concentrações de antimicrobianos, foram simultaneamente incubados em reator orbital à temperatura de 35 °C e agitação a 150 rpm, sendo então avaliados em relação à sua cinética de remoção/formação das formas nitrogenadas envolvidas na nitrificação (NAT , NO_2^- e NO_3^-). A colistina era adicionada aos frascos somente uma hora após o início da reação, permitindo desta forma aferir a igualdade de condições entre os frascos nesta primeira hora, conforme demonstrado a seguir na apresentação dos resultados. Utilizou-se nos experimentos concentração celular de 0,5 g SSV.L^{-1} .

Para o monitoramento das formas nitrogenadas, amostras de 10 mL foram coletadas no instante inicial e a cada hora após o início da reação por um período mínimo de 5 horas. As retiradas de amostras eram feitas com a biomassa suspensa para evitar mudanças na concentração de sólidos no decorrer do experimento. As amostras foram então filtradas com filtro seringa 0,2 μm e acondicionadas em refrigerador.

Nos testes de toxicidade aguda sobre as BOA utilizou-se como meio de cultura o mesmo meio utilizado para alimentação dos reatores, porém, com concentração de nitrogênio amoniacal reduzida para 200 mg N-NAT.L⁻¹ uma vez que estes foram os valores médios encontrados no reator durante a operação e aos quais as células encontravam-se adaptadas. A alcalinidade também foi reduzida proporcionalmente no meio. O meio utilizado para toxicidade aguda sobre as BON difere apenas por possuir unicamente nitrito como substrato (200 mg N-NO₂.L⁻¹) e alcalinidade suficiente apenas para garantir o suprimento de CO₂ necessário ao processo autotrófico.

Considerando-se que os antibióticos frequentemente apresentam uma faixa de concentração inibitória onde o percentual de inibição é correlacionado de forma aproximadamente linear com o logaritmo da concentração do antimicrobiano (RAUTENBACH *et al.*, 2006), optou-se para os testes de toxicidade pela adoção de uma escala de concentrações de colistina que representou uma progressão geométrica indo desde concentrações mais baixas (0,1mg colistina.L⁻¹) até concentrações elevadas e de ocorrência praticamente impraticável no contexto da suinocultura (316 mg colistina.L⁻¹). Desta forma, as concentrações escolhidas para realização dos testes de toxicidade aguda foram: 0,10 (10⁻¹), 0,32 (10^{-0.5}), 1 (10⁰), 3,16 (10^{0.5}), 10 (10¹), 31,6 (10^{1.5}), 100 (10²) e 316 (10^{2.5}) mg.L⁻¹ (cada concentração representando um aumento de 216% em relação à concentração imediatamente inferior). Estes valores referem-se à concentração mássica em colistina, desconsiderando-se a massa de sulfato e, no caso da colistina comercial, a massa de lactose. Tendo em vista que o peso molecular da colistina é 1155,43 g/mol (C₅₂H₉₈N₁₆O₁₃), as concentrações molares correspondentes às concentrações mássicas adotadas foram 8,65x10⁻⁸, 2,74x10⁻⁷, 8,65x10⁻⁷, 2,74x10⁻⁶, 8,65x10⁻⁶, 2,74x10⁻⁵, 8,65x10⁻⁵ e 2,74x10⁻⁴ mol.L⁻¹.

4.4.1.2. Toxicidade crônica sobre a nitrificação

O conjunto de ensaios para verificação da toxicidade da colistina sobre a nitrificação foi concebido visando não apenas a obtenção de dados a respeito da toxicidade aguda destes antibióticos sobre as bactérias nitrificantes, mas principalmente dados a respeito da

exposição crônica destes microrganismos à colistina, condição mais relevante no contexto do tratamento de efluentes.

Para os testes de toxicidade crônica foi utilizado o mesmo reator NTF com pequenas modificações conforme explicado no item 4.1.3 (p. 38). A biomassa, proveniente do reator NTT (livre de contato prévio com qualquer antibiótico), foi submetida à condição de aeração contínua para estabelecimento da nitrificação completa.

Após o estabelecimento da nitrificação o reator foi submetido então a concentrações crescentes de colistina e monitorado durante o período de operação do reator em relação à atividade nitrificante. Diferentemente dos experimentos de toxicidade aguda, neste caso utilizou-se uma escala logarítmica de concentrações de colistina com incrementos menores. Assim os valores de concentração de colistina utilizados foram $0,10 (10^{-1})$, $0,18 (10^{-0,75})$, $0,32 (10^{-0,5})$, $0,56 (10^{-0,25})$, $1 (10^0)$, $1,78 (10^{0,25})$, $3,16 (10^{0,5})$, $5,62 (10^{0,75})$, $10,0 (10^1)$, $17,8 (10^{1,25})$, $31,6 (10^{1,5})$, $56,2 (10^{1,75})$ e $100 (10^{2,0})$ mg colistina.L⁻¹ (cada concentração representando um aumento de 78% em relação à concentração imediatamente inferior), correspondendo às concentrações molares de $8,65 \times 10^{-8}$, $1,54 \times 10^{-7}$, $2,74 \times 10^{-7}$, $4,87 \times 10^{-7}$, $8,65 \times 10^{-7}$, $1,54 \times 10^{-6}$, $2,74 \times 10^{-6}$, $4,87 \times 10^{-6}$, $8,65 \times 10^{-6}$, $1,54 \times 10^{-5}$, $2,74 \times 10^{-5}$, $4,87 \times 10^{-5}$, $8,65 \times 10^{-5}$ mol.L⁻¹.

Além do monitoramento rotineiro do desempenho global do reator, analisando-se o efluente final do mesmo, foram também avaliadas no decorrer de alguns ciclos as velocidades específicas de consumo do nitrogênio amoniacal e do O₂ (QNAT e QO₂, respectivamente) para cada concentração de colistina testada. Nestes ciclos, uma amostra era retirada no início da reação para determinação da concentração celular e das formas nitrogenadas e, depois, a cada hora para visualizar a evolução nas concentrações das formas nitrogenadas no decorrer do ciclo. No início da reação e depois a cada meia hora era feita também uma medição da velocidade global de respiração no reator. A concentração do antibiótico era aumentada a partir do momento em que ficava evidente a estabilidade do reator em relação à fração de amônia oxidada, permanecendo em cada concentração por um período mínimo equivalente a três vezes o tempo de retenção hidráulica mesmo quando não se observava qualquer alteração no comportamento do reator.

O tempo de operação A alteração da concentração do antibiótico era feita sempre que

Os dados de velocidade de conversão do nitrogênio amoniacal (QNAT) foram obtidos a partir dos perfis de concentração do nitrogênio amoniacal durante os ciclos analisados. Deste modo, a velocidade de remoção pôde ser calculada a partir dos coeficientes angulares das retas obtidas durante as horas iniciais do ciclo, onde a velocidade oxidação do nitrogênio amoniacal apresentou-se aproximadamente constante permitindo o emprego de modelos lineares.

Para obtenção do perfil de velocidade específica de consumo de O_2 (QO_2), foram feitas medições no próprio reator onde era medido o decaimento na concentração de O_2 devido ao consumo pelas BOA. Para medição dos níveis de concentração de oxigênio dissolvido foi utilizado um oxímetro portátil de sensor galvânico Oxi 340/SET (marca WTW) conectado a um computador, onde a captura e armazenamento dos dados, realizada a cada 5 seg, foi automatizada com o auxílio do software MultiLab pilot versão 4.71 (WTW). A Figura 7 ilustra este procedimento, onde o coeficiente angular representa a quantidade de O_2 consumida a cada minuto.

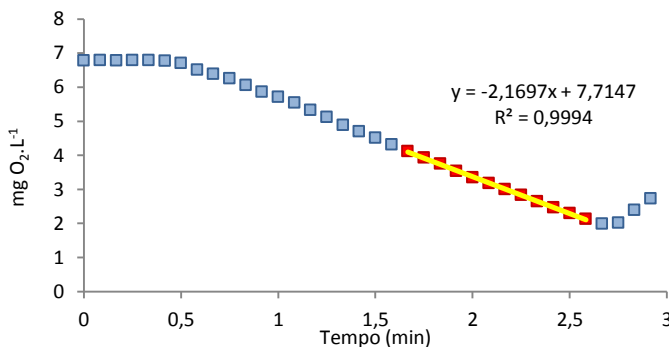


Figura 7: Exemplo ilustrativo de uma respirometria realizada no reator NTF. O coeficiente angular da reta representa o decréscimo na concentração de oxigênio dissolvido em $mg\ O_2 \cdot L^{-1} \cdot min^{-1}$.

Considerou-se apenas a faixa de OD entre 2 e 4 $mg\ O_2 \cdot L^{-1}$ para obtenção dos coeficientes lineares. Como em alguns ciclos, em função da atividade respiratória elevada, o OD ficou abaixo de 5 $mg \cdot L^{-1}$, optou-se pela não utilização de dados acima deste valor para padronização dos resultados. Também não foram considerados valores abaixo de 2 mg

$\text{O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$ pelo fato de haver restrição na velocidade de respiração em função da limitação de O_2 em valores abaixo disso.

4.4.2. Toxicidade sobre a metanogênese acetoclástica

4.4.2.1. Efeitos da exposição crônica sobre atividade metanogênica

Os testes de toxicidade crônica foram realizados no reator UASB (item 4.1.4 – p. 40) após estabelecimento da carga de DQO desejada. De forma similar ao teste de toxicidade crônica sobre a nitrificação, o reator UASB foi submetido a concentrações crescentes do antibiótico até a concentração máxima prevista neste trabalho ($100 \text{ mg colistina} \cdot \text{L}^{-1}$). Foi avaliado o desempenho do reator em termos de remoção de DQO e produção de biogás.

5. Resultados e Discussão

5.1. Toxicidade da colistina sobre a nitrificação

5.1.1. Estabelecimento e manutenção reator nitritante (NTT) para produção de biomassa

A estratégia de manipulação da alcalinidade adotada no início do enriquecimento da biomassa para forçar a seleção de espécies tolerantes às altas concentrações de amônia, descrita no item 4.1.1.1 (pg 32), mostrou-se efetiva para manter os níveis de nitrificação em torno de 50% (Figura 8). Por outro lado, a inibição das BOA antes do término do ciclo por conta da queda do pH promoveu um aumento na concentração de OD durante estes momentos finais do ciclo permitindo o estabelecimento parcial das BON. O reaparecimento de nitrato pode ser observado a partir do 40º dia de operação.

Para amenizar este problema, a partir do 60º dia de operação foi reduzida a duração do ciclo de 12 h para 8 h, mantendo-se o mesmo volume de troca, resultando em um aumento de 50% na carga de nitrogênio amoniacal. Este procedimento foi efetivo para reduzir os períodos com oxigênio excedente aos finais de ciclo, permitindo a retomada da inibição das BON.

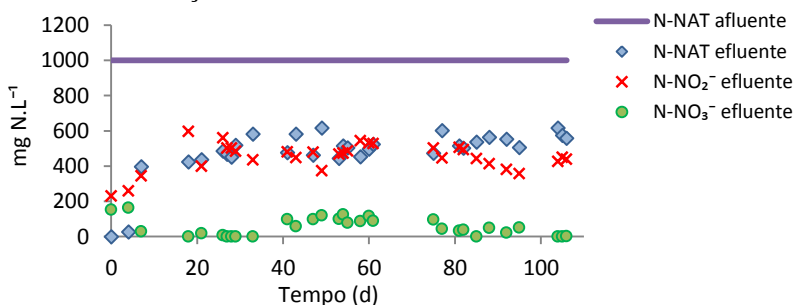


Figura 8: Concentração das formas nitrogenadas no período inicial de enriquecimento e aclimação da biomassa nitritante.

Após este período inicial a biomassa foi integralmente transferida para o reator NTT, que foi então continuamente operado por um período superior a dois anos sem restrição de alcalinidade, sendo mantida durante todo este período a condição de nitrificação parcial utilizando o recurso da aeração intermitente para inibição das BON (Figura 9). Dados em anexo (Anexo 1).

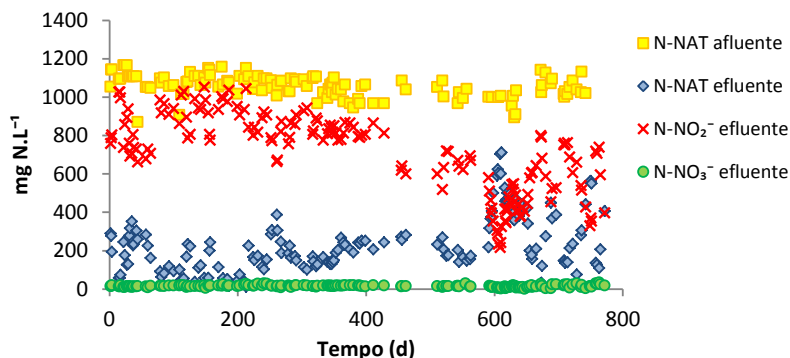


Figura 9: Concentração das formas nitrogenadas presentes no meio de cultura e no efluente após transferência para reator 5 L (reator NTT). Após a transferência da biomassa a contagem dos dias de operação foi reiniciada.

A variação no desempenho do reator em relação à oxidação do nitrogênio amoniacal não foi considerada uma característica negativa, uma vez que o propósito do reator era a produção de células para os experimentos de toxicidade aguda sobre as BOA, e o nitrogênio amoniacal excedente ao final dos ciclos favorecia ainda mais o método adotado de inibição das BON através da aeração intermitente. Muitas destas ocorrências de perda de desempenho no reator em relação à oxidação da amônia foram ocasionadas pela retirada de células para os testes citados de toxicidade sendo mantida a mesma carga na alimentação.

A estratégia de aeração intermitente demonstrou-se efetiva para manutenção da nitrificação parcial. Porém, para maior estabilidade do reator, foram necessárias, eventualmente, pequenas retiradas de biomassa (remoção de 20% da biomassa a cada retirada). Um fator determinante para alcançar a estabilidade na resposta do sistema e conseguir uma operação mais estável do reator foi o estabelecimento da

capacidade de transferência de oxigênio como fator limitante da velocidade máxima do processo, limitando assim as variações causadas na velocidade do processo em função do crescimento celular. Operado desta maneira, os níveis de conversão de nitrito a nitrato se mantiveram durante todo o período na ordem de 2% apenas (Figura 10), com conversão de nitrogênio amoniacal mantida em torno de 80-90%.

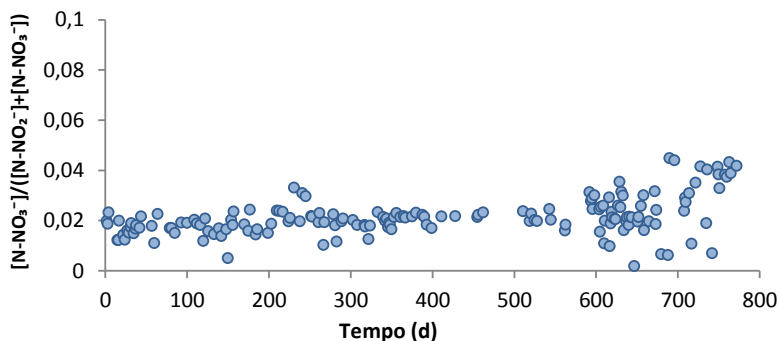


Figura 10: Fração de nitrito oxidada a nitrato observada no reator nitrificante (NTT) ao longo da operação do reator.

A biomassa assim obtida no reator NTT podia ser considerada uma comunidade estável e provavelmente diversificada de BOA, adaptadas ao crescimento sob concentrações relativamente elevadas de nitrogênio amoniacal (200-300 mg N-NAT.L⁻¹), resultantes de um longo período de operação do reator sob a condição de nitrificação parcial. A obtenção de um processo estável com idade de lodo avançada, resultando em maior diversidade biológica e estabilidade em termos de composição de espécies se comparado à um lodo com idade reduzida, era uma característica amplamente desejável para obter uma maior padronização em relação à biomassa utilizada como inóculo nos experimentos de toxicidade e, principalmente, por permitir explorar melhor a capacidade de adaptação dos sistemas nitrificantes à exposição crônica ao antibiótico.

5.1.1.1. Caracterização geral da biomassa por FISH (hibridização fluorescente *in situ*)

Para análise da biomassa por FISH, uma amostra foi retirada no 193º dia de operação. Como era desejado em função das condições de nitrificação parcial impostas ao reator, o grupo predominante na biomassa do reator foi o das BOA (Figura 11), sendo muito pouco frequentes colônias de oxidadoras de nitrito (grupo das *Nitrobacter*) (Figura 12-A). A análise microscópica demonstrou que as bactérias nitrificantes, tanto as BOA como as BON, estavam presentes nas amostras sob a forma de densas microcolônias, aproximadamente esféricas e contendo de poucas a centenas de células, sendo praticamente inexistente a ocorrência de células nitrificantes livres. As BON ocorreram em quantidades bastante reduzidas, indicando que o processo permitiu a obtenção de uma biomassa formada essencialmente por BOA.

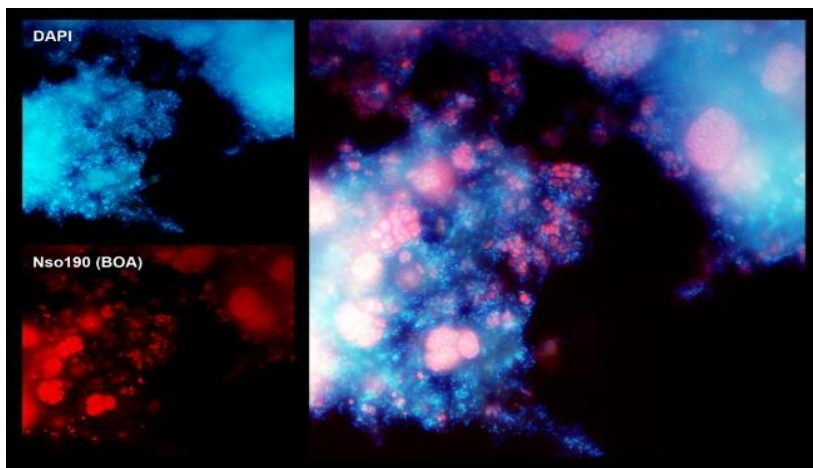


Figura 11: Fotomicrografia obtida por microscopia de epifluorescência de células oxidadoras de amônia identificadas por hidrização fluorescente *in situ* (FISH) utilizando a sonda Nso190.

Foram também observadas no reator, apesar de muito raras, microcolônias de ANAMMOX (Figura 12-B), o que não surpreende devido ao fato que o reator operou frequentemente com níveis

relativamente elevados de amônia e nitrito. As condições estritamente anóxicas necessárias para sua sobrevivência poderiam, teoricamente, ser encontradas no interior dos flocos. A presença muito reduzida de ANAMMOX é corroborada pelos resultados físico-químicos, onde não se observa remoção relevante do nitrogênio, encontrando-se no efluente final quase que integralmente sob a forma de nitrito e nitrogênio amoniacal.

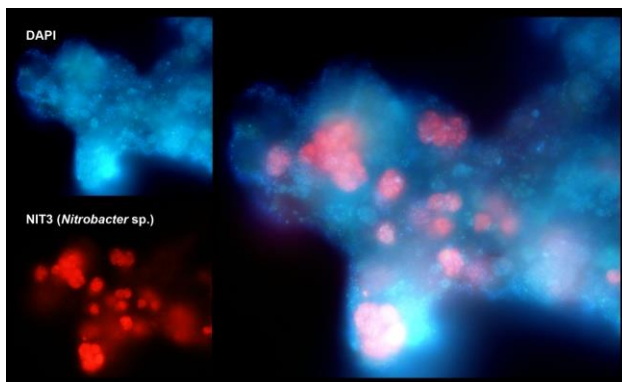
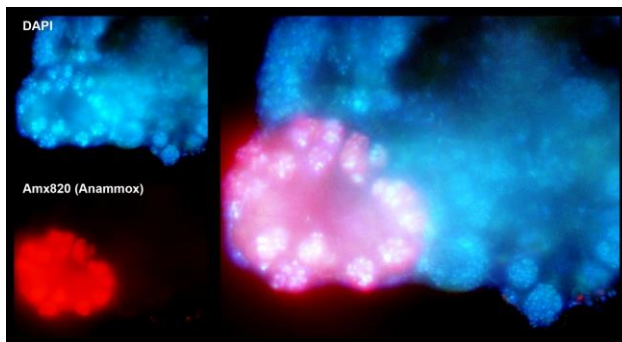
A**B**

Figura 12: Fotomicrografias obtidas por microscopia de epifluorescência para as sondas NIT3 (A) e Amx820 (B), específicas para espécies do gênero *Nitrobacter* (oxidadoras de nitrito) e ANAMMOX, respectivamente.

No entanto, há a ocorrência de uma parcela significativa da biomassa que não reagiu para nenhum dos grupos relacionados ao metabolismo do nitrogênio. Estes organismos poderiam ser bactérias heterotróficas associadas à biomassa nitrificante. Além da matéria orgânica proveniente da morte celular estas células poderiam também estar utilizando compostos orgânicos solúveis produzidos pelas bactérias nitrificantes. Sabe-se que estes organismos autotróficos são capazes de produzir compostos orgânicos solúveis que podem ser utilizados pelas bactérias heterotróficas. Estes produtos participam do processo de decaimento celular das nitrificantes, reduzindo a geração de biomassa (RITTMANN e MCCARTY, 2001). De um modo geral, nas amostras observadas são estas células que formam a estrutura básica dos flocos, mantendo as microcolônias nitrificantes unidas. Estimou-se a partir da análise das imagens obtidas na microscopia confocal de varredura a laser que a fração destes organismos na biomassa total possa chegar a 20-30%. A Figura 13 ilustra uma reconstituição tridimensional utilizada para análise das imagens.

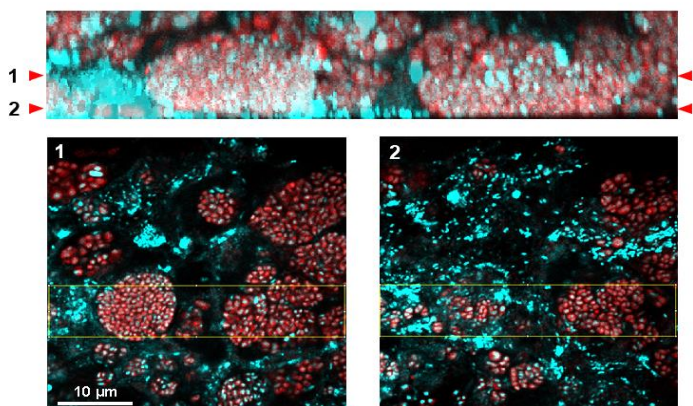


Figura 13: A imagem no alto corresponde à uma secção transversal do material aderido sobre a lâmina de FISH reconstituída tridimensionalmente a partir de uma sequência vertical de imagens capturadas em microscopia confocal de varredura a laser, com elevação do plano focal de 0,1 μm a cada captura. As duas imagens abaixo desta correspondem às imagens capturadas nos planos focais 1 e 2 indicados na figura superior, sendo que o quadro amarelo presente em ambas as imagens representa a área utilizada para renderização da imagem visualizada acima a partir da superposição das imagens.

5.1.2. Estabelecimento dos reatores nitrificantes (NTF) para produção de biomassa

Foi necessário um período de aproximadamente 20 dias para estabelecimento da nitrificação completa a partir da biomassa retirada do reator NTT (Figura 14). Observou-se uma perda de aproximadamente 20% do nitrogênio durante os ciclos, provavelmente devido ao processo de elevação do pH pela aeração no início do ciclo (substituição parcial da alcalinidade em carbonato por alcalinidade em hidróxido) e consequente perda de parte da amônia pelo arraste com a aeração. Este efeito pode ser reduzido pelo aumento da quantidade de biomassa utilizada como inóculo, aumentando a atividade de oxidação da amônia e, consequentemente, menor subida do pH no início do ciclo, resultando em menor perda do nitrogênio amoniacal no início do ciclo.

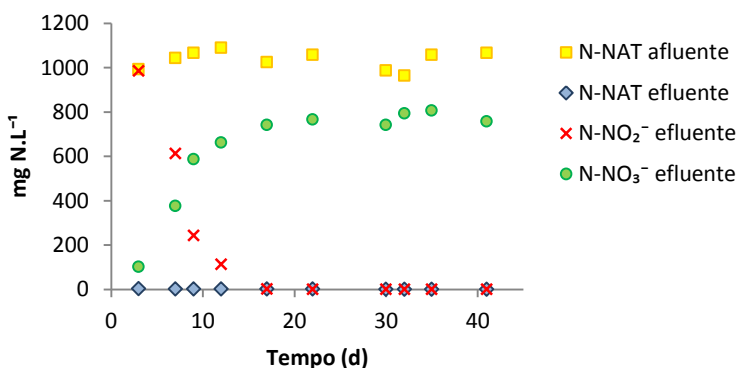


Figura 14: Variação das formas nitrogenadas no efluente final do reator e no meio de alimentação durante a fase inicial de estabelecimento da nitrificação completa no reator NTF.

Como a cada experimento de toxicidade aguda sobre as BON utilizava-se praticamente toda a biomassa do reator, o mesmo teve de ser reiniciado algumas vezes, sempre inoculado e operado da mesma maneira, conforme descrito no item 4.1.2.3 (p. 38).

Operado desta forma, o reator NTF normalmente alcançava concentrações de biomassa na ordem de 2,5 a 3 g SSV.L⁻¹; acima destas concentrações o crescimento celular estabilizava tornando-se mais lento.

5.1.3. Toxicidade aguda da colistina sobre a nitrificação

5.1.3.1. Toxicidade aguda da colistina (polimixina E) sobre a microbiota oxidadora de amônia

Para os testes de toxicidade aguda da colistina sobre as BOA, a biomassa nitrificante, proveniente do reator NTT, foi cultivada em incubadora com agitação orbital (*shaker*) sob diferentes concentrações de colistina e avaliada em relação à sua cinética de nitrificação. Dados em anexo (Anexo 2).

Como era esperado em função do uso de uma biomassa essencialmente composta de BOA, com rara ocorrência de BON, em todos os experimentos de toxicidade aguda sobre as BOA a formação de nitrato foi totalmente inexpressiva durante toda a batelada, permitindo utilizar apenas a velocidade de formação do nitrito como indicativo da atividade celular. A concentração de nitrogênio amoniacal como indicativo foi desprezada em função do fato de não ser a sua remoção devida somente à ação das BOA, mas também em função do arraste com a aeração nos valores elevados de pH alcançados nos experimentos, algumas vezes chegando a 8,0 durante a batelada.

A Figura 15 apresenta os perfis de concentração de NO_2^- encontrados em um dos dois experimentos realizados com a colistina comercial (colistina_{com}). Observa-se nestes resultados que mesmo a menor concentração de antibiótico testada ($1 \text{ mg colistina.L}^{-1}$) já foi suficiente para causar alguma inibição no processo, apesar de ser pouco relevante. Assim, para os experimentos seguintes incluiu-se também a concentração $10^{-0,5}$ ($0,32 \text{ mg colistina.L}^{-1}$) nos testes. Com base nestes resultados, para obtenção das velocidades de formação do N-NO_2^- foi também desconsiderada a primeira hora após a adição do antibiótico por não ser aparentemente imediata a sua ação e, portanto, ainda não refletir durante estes primeiros minutos o grau real de inibição ocasionado. Desta forma, as velocidades de produção de nitrito consideradas para elaboração dos gráficos apresentados nas Figuras 17 e 18 são aquelas obtidas a partir da 2ª hora após início do experimento até a 5ª hora.

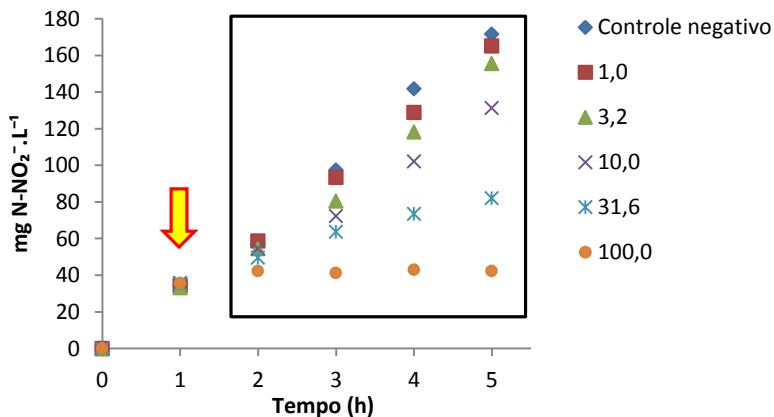


Figura 15: Acúmulo de nitrito em função da concentração de colistina (mg.L^{-1}) em experimento de toxicidade aguda realizado com BOA e colistina comercial ($\text{colistina}_{\text{com}}$). A seta indica o momento de introdução do antibiótico, e o quadro delimita os pontos considerados para obtenção das velocidades de formação.

Foram realizados dois experimentos com cada uma das colistinas disponíveis ($\text{colistina}_{\text{com}}$ e $\text{colistina}_{\text{mp}}$), apresentados nas Figuras 16 e 17, respectivamente, e Tabela 13. Para modelagem dos dados utilizou-se o polinômio que melhor descrevesse os dados principalmente na faixa de inibição, dando-se menor importância à região de baixa inibição. Assim, para o ajuste dos dados de inibição, em ambos os casos ($\text{colistina}_{\text{com}}$ e $\text{colistina}_{\text{mp}}$), foi utilizado um polinômio de 2ª ordem, a partir do qual foi possível encontrar uma CI-50 (concentração necessária para reduzir em 50% a atividade celular) de 10,8 e 67 $\text{mg colistina.L}^{-1}$, respectivamente. A relação não linear observada pode resultar do fato de estar sendo utilizada uma cultura mista, onde as inúmeras espécies que compõem a biomassa podem apresentar diferentes sensibilidades ao antimicrobiano, portanto com diferentes CI-50, distorcendo a linearidade da faixa de inibição.

A $\text{colistina}_{\text{com}}$ ocasionou maior inibição que a $\text{colistina}_{\text{mp}}$ utilizada como matéria-prima, fato este que não pôde ser explicado com base nas informações disponíveis, já que a única diferença entre as duas colistinas era a presença da lactose na formulação comercial. No entanto, as concentrações inibitórias encontradas para as BOA são da mesma ordem de grandeza que as concentrações propostas para aplicação na água para fins terapêuticos (recomendação de 50 mg

colistina.L⁻¹ de água para suínos), evidenciando que a sua utilização nestas concentrações poderia afetar negativamente as BOA nas estações de tratamento se considerarmos que trata-se de um antibiótico com alta estabilidade. Quando utilizada, porém, de forma contínua como promotor de crescimento, as concentrações de uso recomendadas são bastante inferiores, dificilmente alcançando concentrações relevantes no efluente final.

Tabela 13: Percentuais de inibição encontrados nos experimentos de toxicidade aguda para a colistina comercial e para a colistina pura proveniente da indústria. Foram testadas diferentes concentrações de antibióticos variando de 10⁻¹ a 10^{2,5} mg colistina.L⁻¹.

Log [colistina] (mg.L ⁻¹)	Colistina _{com}			Colistina _{mp}		
	Exp. 1	Exp. 2	Média	Exp. 1	Exp. 2	Média
-1		6,1	6,1			
-0.5		7,8	7,8	0,0	0,0	0,0
0	17,2	5,7	11,5	0,5	-	0,5
0.5	24,7	-	24,7	0,0	7,0	3,5
1	43,6	54,9	49,3	2,4	28,4	15,4
1.5	71,8	77,5	74,7	-	36,0	36,0
2	99,1	99,2	99,2	41,5	71,1	56,3
2.5				94,6	98,7	96,7

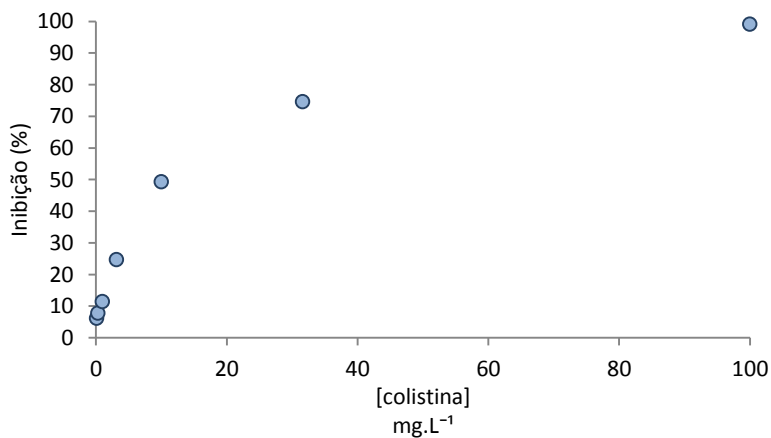
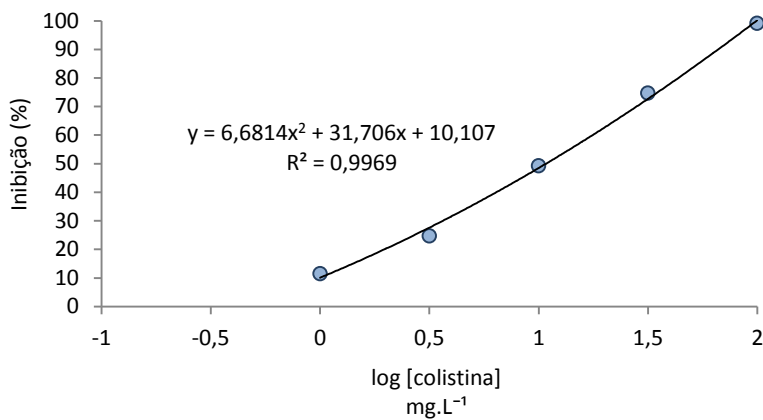
A**B**

Figura 16: Correlação entre o grau de inibição sobre a nitrificação e a concentração de colistina comercial (colistina_{com}). (A) Inibição em função da concentração de colistina, apresentando apenas a faixa de inibição; (B) Inibição em função do logaritmo da concentração de colistina.

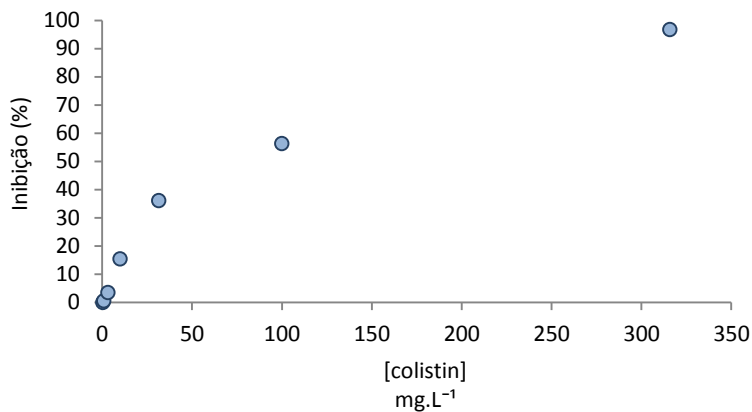
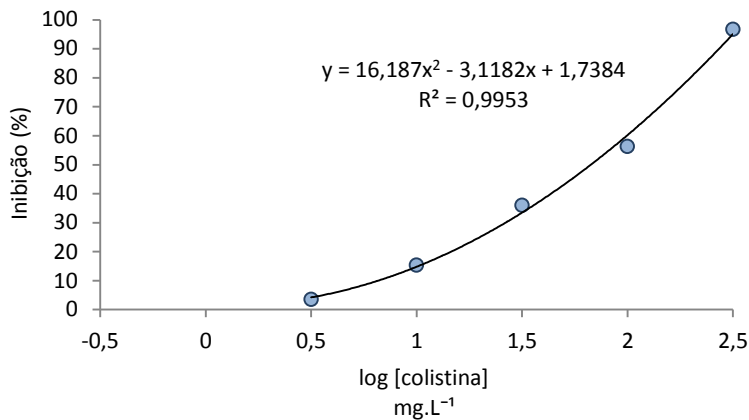
A**B**

Figura 17: Correlação entre o grau de inibição e a concentração de colistina pura (colistina_{mp}). (A) Inibição em função da concentração de colistina, apresentando apenas a faixa de inibição; (B) Inibição em função do logaritmo da concentração de colistina.

5.1.3.2. Toxicidade aguda do antibiótico sulfato de colistina (polimixina E) sobre a microbiota oxidadora de nitrito

Apesar de serem também bactérias gram-negativas como as BOA, as BON mostraram-se altamente resistentes à colistina. Mesmo a concentração mais elevada do antimicrobiano no teste (316 mg colistina.L⁻¹) foi incapaz de causar um efeito inibitório muito pronunciado sobre este grupo (Figuras 18). Estes dados surpreendem, uma vez que de um modo geral o grupo das BON costuma ser mais sensível a agentes citotóxicos que o grupo das BOA (KÜMMERER, 2009a). Portanto, segundo estes resultados, espera-se que em um sistema nitrificante sob inibição de colistina ocorra acúmulo de nitrogênio amoniacal e não NO₂⁻ como em muitos casos de inibição. Em um sistema nitrificante que sofre ação da colistina, somente o grupo da BOA seria afetado, reduzindo sua velocidade e resultando na redução na disponibilidade de substrato para as BON. Como a atividade das BON aparentemente não é afetada, não há motivos para esperar acúmulo de nitrito já que não apenas a quantidade de substrato para estas células seria reduzida como, em alguns casos, poderia haver um aumento nos níveis de OD em função da redução na velocidade de respiração das BOA.

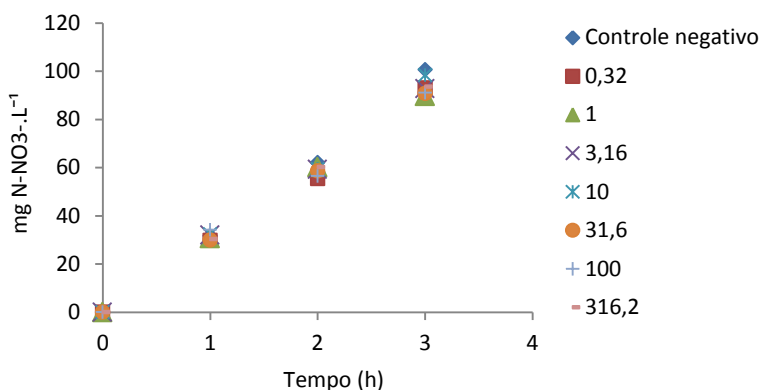


Figura 18: Acúmulo de nitrato nos frascos ao longo de um dos experimentos de toxicidade aguda da colistina sobre as BON.

Com base nestes resultados, supõe-se que, dependendo da sua concentração no reator, a presença de colistina poderia afetar também a estabilidade de processos do tipo SHARON (sistemas de nitrificação parcial) pelo favorecimento das BON. Os processos de nitrificação parcial baseiam-se na criação de condições adequadas que possibilitem o favorecimento das BOA em relação às BON, geralmente através de estratégias que promovam uma vantagem competitiva para as BOA, permitindo a inibição do crescimento das BON. O desfavorecimento seletivo das BOA com a presença da colistina poderia desequilibrar esta condição, permitindo o crescimento das BON e, conseqüentemente, falência do sistema de nitrificação parcial.

Ambos os experimentos (duplicata) foram interrompidos antes das 5 horas previstas por não haver qualquer toxicidade evidente já nas primeiras 2 horas de ensaio após adição do antibiótico.

5.1.4. Toxicidade crônica da colistina sobre a nitrificação

5.1.4.1. Avaliação da influência da presença de alcalinidade em carbonato sobre a velocidade de nitrificação

Como a fração de CO_2 no ar é baixa (0,039% ou 393 ppm) e havia a intenção de utilizar neste experimento apenas o CO_2 proveniente da aeração, avaliou-se inicialmente a importância da presença de bicarbonato no reator como fonte de CO_2 para a atividade nitrificante através um experimento preliminar simples, realizado no próprio reator, onde foram feitas medições consecutivas da velocidade de respiração celular adicionando-se quantidades crescentes de bicarbonato (0,1, 0,25, 0,5 e 1 g $\text{HCO}_3^- \cdot \text{L}^{-1}$), com pH mantido constante em 7,5. O reator encontrava-se operando sem bicarbonato e, como o objetivo do teste era apenas verificar se haveria aumento significativo da velocidade de respiração em função da adição de bicarbonato no meio, optou-se por este procedimento pela sua facilidade de execução, padronização das condições entre as medições e, principalmente, por permitir fazer a verificação no próprio reator sob as condições normais de operação do mesmo, especialmente em relação à capacidade de transferência de CO_2 .

Em pH 7,5 (valor do pH no reator) o carbonato encontra-se predominantemente sob a forma de bicarbonato, estando sob a forma de $\text{CO}_{2\text{aq}}$ uma fração aproximada de 6,6% do total do sistema carbonato, como se observa no diagrama pC-pH (-log da concentração relativa dos compostos *versus* pH) apresentado na Figura 19, onde é destacada a concentração relativa de $\text{CO}_{2\text{aq}}$ para o pH de 7,5 do reator. O diagrama pC-pH foi elaborado conforme metodologia descrita por Snoeyink e Jenkins (1980)

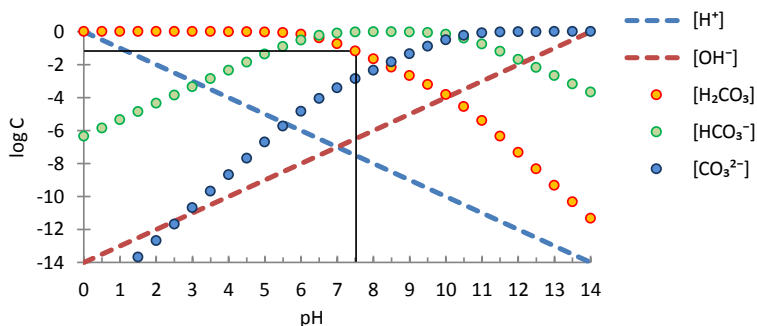


Figura 19: Diagrama pC-pH (log da concentração relativa dos compostos *versus* pH) onde é apresentada a distribuição das formas químicas do sistema carbonato em função do pH, onde $[\text{CO}_{2(\text{aq})}] + [\text{HCO}_3^-] + [\text{CO}_3^{2-}] = 1$. Está destacado no a concentração relativa de $\text{CO}_{2(\text{aq})}$ para o pH 7,5 (elaborado de acordo com Snoeyink e Jenkins (1980)).

As adições de alcalinidade se sobrepunham, de modo que a concentração exata de CO_2 no reator a cada pulso medido não era possível de ser determinada de forma precisa. Contudo, mesmo considerando-se o consumo total da alcalinidade entre cada pulso, na adição do maior pulso a concentração mínima de $\text{CO}_{2\text{aq}}$ estimada foi de 66 mg.L^{-1} , valor bem acima do mínimo de 5 mg.L^{-1} proposto na literatura para que seja mantida a velocidade máxima do processo (DENECKE e LIEBIG, 2003).

Neste experimento não foi observada qualquer aumento na velocidade de respiração em função da presença de bicarbonato no meio (Figura 20), porém não pode ser excluída a possibilidade de uma resposta mais lenta da biomassa à elevação da concentração do CO_2 ,

tendo em vista que o experimento foi realizado em um período total de aproximadamente 10 minutos.

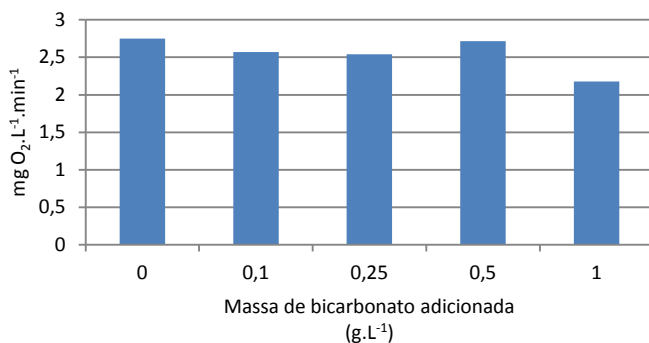


Figura 20: Velocidade de respiração celular obtidas em função da concentração de bicarbonato adicionada ao reator.

Assim, como o principal objetivo era ter a concentração de CO₂ com o mínimo de variação ao longo do ciclo, optou-se pela não utilização de alcalinidade carbonácea como fonte de CO₂ como nos demais experimentos, pois a sua utilização, em teoria, poderia promover uma variação na disponibilidade do CO₂ maior do que o fornecimento do mesmo pela aeração, que neste caso seria definida pela velocidade de transferência do gás para o meio líquido.

A utilização de alcalinidade carbonácea estequiométrica como nos demais experimentos, ou abaixo disso, criaria uma condição indesejável, pois iniciaria o ciclo com alta disponibilidade de CO₂ e terminaria, pelo menos nos casos de maior atividade com consumo de todo o nitrogênio amoniacal no ciclo, restrito ao CO₂ transferido pela aeração. O uso de alcalinidade carbonácea no meio de cultura promoveria uma tendência de subida de pH no início do ciclo pelo arraste do CO₂ e consequente substituição de alcalinidade carbonácea por alcalinidade hidroxílica, forçando o sistema de controle de pH a injetar ácido para conter a subida do pH. Isso resulta na perda de alcalinidade total desequilibrando a relação estequiométrica. Assim, a falta de alcalinidade carbonácea ao final do ciclo limitaria o fornecimento de CO₂ àquele proveniente da aeração nestes momentos.

Considerando-se a estequiometria proposta na equação 3 (p. 24), segundo a qual a relação de consumo O₂:CO₂ é de 17,4 moles de O₂

/ mol de CO_2 incorporado na biomassa, pode-se estimar que para uma velocidade de consumo de $2,5 \text{ mg O}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ (valor normalmente observado nos experimentos ficava abaixo disso) a velocidade máxima estimada de consumo do CO_2 seria de $0,2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, necessitando, portanto, que o sistema de aeração possibilitasse esta velocidade de transferência do CO_2 .

Considerou-se ainda que anteriormente à etapa de adição do antibiótico operou-se o reator com velocidades de consumo de CO_2 superiores, em função de maior concentração celular, e sem adição de alcalinidade, indicando que o reator apresentava capacidade de transferência de CO_2 superior àquela necessária no período de adição do antibiótico, quando o reator foi operado com menor quantidade de biomassa e, portanto, velocidades mais reduzidas de consumo do mesmo. Também foi considerado o fato de que níveis de CO_2 superiores a $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ passam a ter efeitos inibitórios para a atividade nitrificante (DENECKE e LIEBIG, 2003).

5.1.4.2. Teste de toxicidade crônica sobre a nitrificação

Para avaliação da tolerância da microbiota nitrificante à presença crônica de colistina no reator, uma cultura mista nitrificante foi exposta a concentrações crescentes de colistina em um reator do tipo SBR, conforme descrito no item 4.4.1.2 (p. 47), por um período total de aproximadamente 150 dias. As velocidades de oxidação do nitrogênio amoniacal e consumo de oxigênio (QO_2X) foram monitoradas ao longo de alguns ciclos durante este período para identificar potenciais efeitos inibitórios decorrentes da presença do antibiótico. Os dados encontram-se em anexo (Anexos 3, 4 e 5). A Figura 21 apresenta, para fins de exemplo, os dados do monitoramento cinético de um ciclo, ainda no início do experimento, antes de iniciar a adição de colistina.

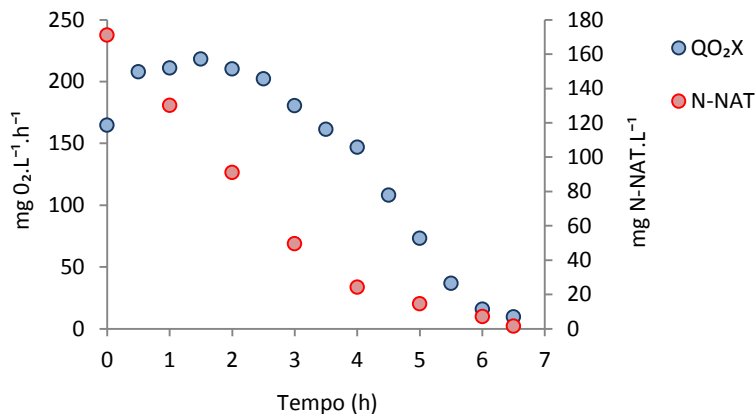


Figura 21: Acompanhamento da concentração de nitrogênio amoniacal e da velocidade de respiração ao longo de um ciclo do reator SBR (fase de reação apenas). Dados obtidos no 67º dia de operação do reator, antes do início da adição de colistina ao reator.

Com estes dados, juntamente com os dados de concentração de biomassa, foram obtidos valores de velocidade específica de consumo de nitrogênio amoniacal e oxigênio para cada ciclo avaliado ao longo do período (Figura 22). Como a velocidade de respiração mostrou-se variável ao longo de um dado ciclo, optou-se pela utilização somente dos dados de respirometria obtidos exatamente uma hora após o início do ciclo do reator, que por representarem medidas de velocidades instantâneas, permitem uma maior padronização nos dados em relação ao tempo de exposição da biomassa ao antibiótico após a alimentação. O consumo de nitrogênio amoniacal, por outro lado, foi determinado a partir de uma reta obtida durante a fase linear de consumo do nitrogênio amoniacal, de modo que refletem um valor médio das diferentes velocidades observadas durante aquele período avaliado do ciclo.

Nas fases iniciais do experimento, onde foi possível observar uma correlação direta entre a atividade microbiana global e a concentração de biomassa, os dados de respirometria apresentaram uma melhor correlação com a concentração de biomassa que os dados de remoção de nitrogênio amoniacal, apontando para uma maior precisão dos dados respirométricos. Desta forma, optou-se pela utilização apenas dos dados de respirometria para análise da toxicidade.

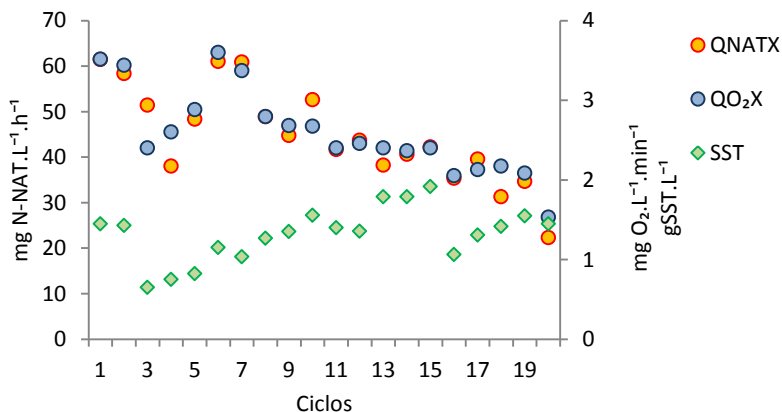


Figura 22: Velocidade global de consumo de amônia (QNATX) e de oxigênio QO₂X e concentração de biomassa ao longo do experimento. O espaço de tempo entre cada ciclo apresentado é variável.

Os dados evidenciaram, especialmente nas fases iniciais do experimento onde não se observou inibição aparente pelo antibiótico, que a concentração de biomassa participa de forma parcial na determinação da velocidade global no reator, não havendo uma variação na velocidade de oxidação da amônia proporcional à variação na concentração de biomassa, mesmo não havendo limitação na quantidade de oxigênio dissolvido. Como consequência, os valores de velocidade específica obtidos ao longo do experimento apresentaram uma variação que foi ocasionada não apenas pela variação na concentração do antibiótico, mas também devida às variações na concentração de biomassa. Como se pode observar na Figura 23, onde são apresentados dados do início do experimento enquanto ainda não havia inibição perceptível do antibiótico, as variações observadas nas velocidades específicas eram determinadas predominantemente pela variação na concentração de biomassa.

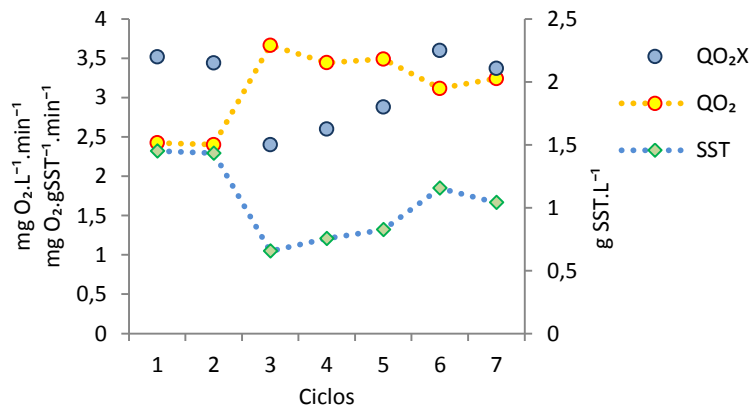


Figura 23: Variação nas concentrações de SST e nas velocidades globais e específicas de consumo de O_2 . O espaço de tempo entre cada ciclo apresentado é variável.

Todavia, a correlação aproximadamente linear entre a atividade específica e a concentração de biomassa (Figura 24), permitiu a obtenção de uma equação linear na faixa de concentração de biomassa avaliada, dando origem à equação 7 a partir da qual foi feita a normalização dos dados para a concentração de $1\ g\ SST.L^{-1}$.

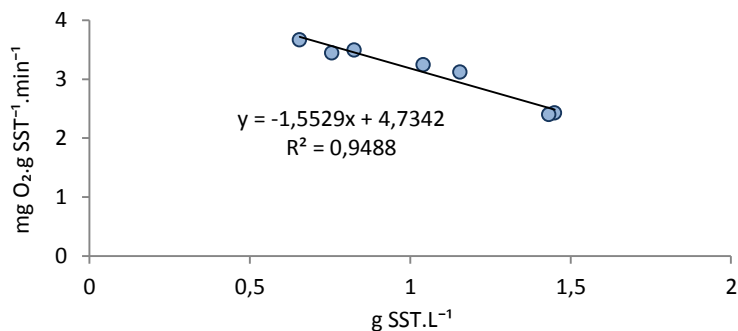


Figura 24: Variação da atividade específica de consumo de O_2 em função da concentração de biomassa no reator a partir dos dados apresentados na Figura 23.

$$QO_2^* = QO_2 \times (3,18/(-1,55 \times [SST] + 4,73)) \quad (\text{Eq. 7})$$

A normalização dos dados para a concentração de 1 g SST.L⁻¹ consistiu em subtrair do valor medido de atividade específica a variação relativa indicada pelo modelo em função da concentração de biomassa. Este procedimento é demonstrado graficamente na figura Figura 25.

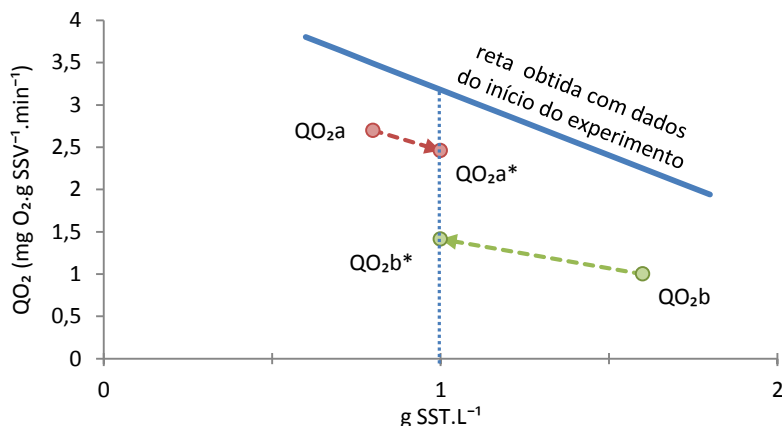


Figura 25: Representação gráfica do procedimento de normalização aplicado aos dados de velocidade específica de consumo de oxigênio (QO₂). QO_{2a}* e QO_{2b}* são valores calculados a partir do modelo obtido de variação relativa da atividade específica em função da concentração de biomassa.

Este procedimento foi necessário devido ao fato de que a variação na concentração de biomassa no reator somou-se aos efeitos inibitórios do antibiótico, impossibilitando a determinação do grau de inibição do mesmo ao longo do experimento.

A Figura 26 apresenta os valores de QO₂ originais e após normalização para 1g SST.L⁻¹ (QO₂*) juntamente com os dados de concentração de SST, evidenciando o aumento progressivo no grau de inibição do processo. Estes dados demonstram claramente a dificuldade de interpretação dos dados de QO₂ não normalizados devido à sua correlação com a concentração de biomassa.

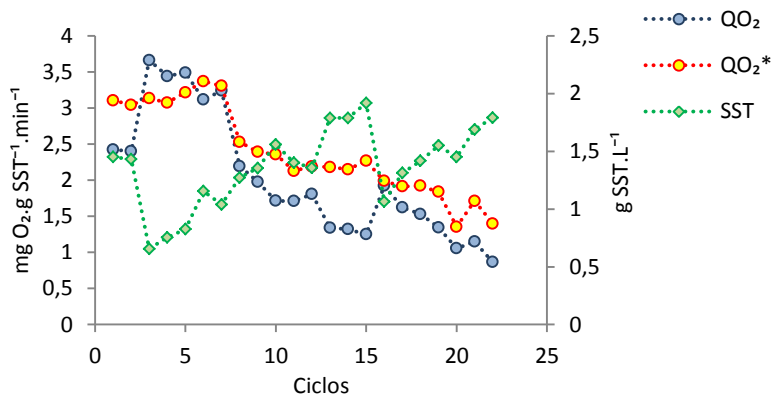


Figura 26: Valores de QO₂, QO₂* e concentração de SST durante o período de análise da toxicidade crônica da colistina sobre a biomassa nitrificante. O espaço de tempo entre cada ciclo apresentado é variável.

A correlação entre as velocidades específicas normalizadas (QO₂*) e a concentração de colistina empregada demonstra uma redução da atividade específica somente a partir da concentração de 1 mg colistina.L⁻¹ (Figura 27). Observa-se, inclusive, redução na velocidade da respiração global acima desta concentração, mesmo com um aumento simultâneo na concentração de biomassa.

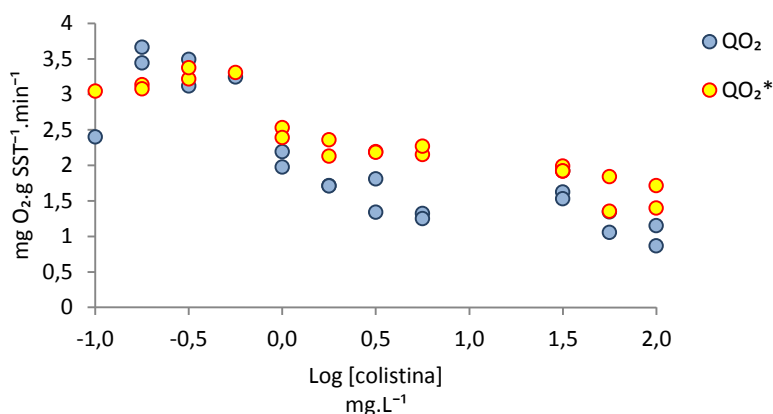


Figura 27: Velocidade específica de consumo de oxigênio em função do logaritmo da concentração de colistina. Dados brutos (QO₂) e normalizados para 1g SST (QO₂*).

Apesar de ter sido verificada inibição sobre as BOA nas análises respirométricas já a partir de 1 mg colistina.L⁻¹, efeitos relevantes sobre o desempenho geral do reator só foram observados a partir de concentrações mais elevadas (~50 mg colistina.L⁻¹), conforme pode ser observado na Figura 28 e 29. Isso pode ser facilmente compreendido considerando-se que no início do experimento o reator estava operando com tempo de reação superior ao necessário para oxidação do nitrogênio amoniacal, assim, pequenas variações na velocidade não seriam suficientes para acarretar um acúmulo de nitrogênio amoniacal ao final dos ciclos.

Na concentração de 100 mg colistina.L⁻¹, contudo, o reator apresentou uma perda gradual na sua eficiência levando à falência quase completa da nitrificação ao longo de um período de aproximadamente 20 dias. A redução de apenas ~50% na velocidade específica de respiração nas análises respirométricas deve-se ao fato de que a última análise respirométrica fora realizada no 218º dia de operação, quando o reator também apresentava, ainda, índices de remoção de amônia na ordem de 50%. É interessante ressaltar que nas etapas finais, este declínio da eficiência do reator ocorreu sem qualquer retirada de biomassa, de modo que se pode esperar um efeito ainda mais acentuado, provavelmente já ocorrendo em concentrações mais baixas de colistina, no caso de um sistema de tratamento com retiradas sistemáticas de biomassa. Já foi relatado que devido ao lento crescimento da biomassa nitrificante, inibições mesmo que parciais podem ocasionar uma paralisação completa do processo de nitrificação pela lavagem das células nitrificantes do reator. Todavia este processo é lento, levando várias semanas para a paralisação completa do processo de nitrificação (BERNET e SPÉRANDIO, 2009).

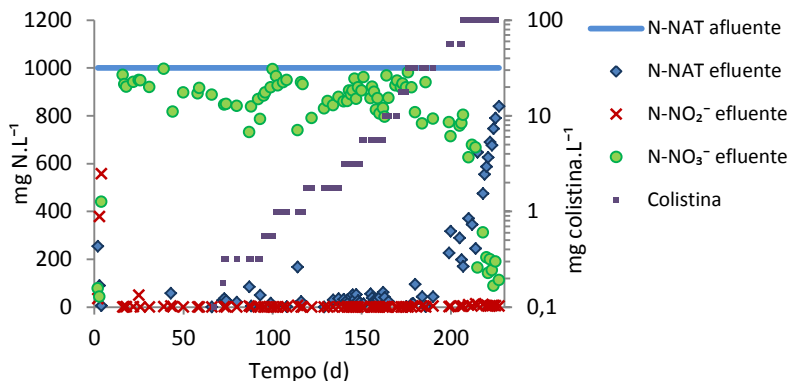


Figura 28: Desempenho do reator NTF_{tox} ao longo do período de operação. São apresentadas as concentrações das formas nitrogenadas no efluente final (N-NAT, N-NO_2^- e N-NO_3^-) e na alimentação (N-NAT) e concentração de colistina no meio de cultura.

Como era esperado, com base nos dados de toxicidade aguda, não se observou no reator inibição sobre as BON. Em nenhum momento durante os monitoramentos cinéticos dos ciclos ou no efluente final do reator foi possível se observar a presença de nitrito.

Para fins de comparação entre os dados de toxicidade aguda e crônica consideraram-se apenas os dados de toxicidade aguda obtidos com a colistina_{mp}, por ser o mesmo composto utilizado na toxicidade crônica. De acordo com estes resultados, a toxicidade crônica mostrou-se mais severa que a toxicidade aguda, corroborando dados da literatura (KÜMMERER, 2009a).

Apesar das diferenças nas CI_{50} não serem tão evidentes, com valores em torno de 60 a 70 mg colistina.L⁻¹ em ambos os casos, na concentração de 100 mg.L⁻¹ a diferença entre a toxicidade aguda e crônica foi mais acentuada. Enquanto na toxicidade aguda a inibição com 100 mg colistin.L⁻¹ ficou em torno de 60%, na toxicidade crônica esta mesma concentração levou à uma gradativa perda de atividade até a falência quase completa da nitrificação no reator. Se for considerada a possibilidade de degradação da colistina no reator, então a severidade da toxicidade crônica seria ainda maior, já que a concentração do antimicrobiano após a alimentação sofreria um efeito de diluição

resultando em uma concentração final no reator menor que a concentração utilizada no meio de alimentação.

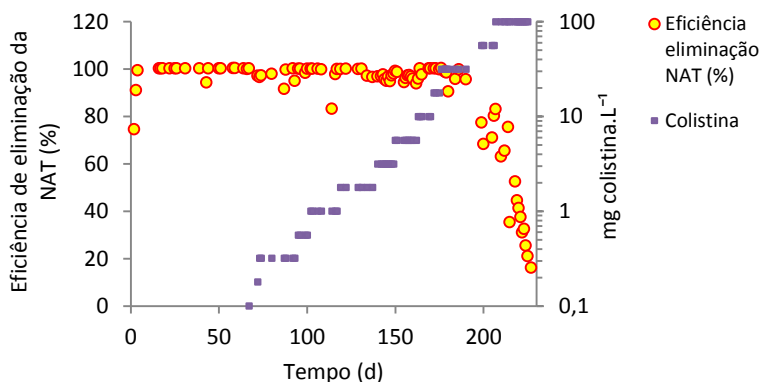


Figura 29: Eficiência de remoção da amônia durante os ciclos e concentração de colistina aplicada ao longo do experimento.

Os dados obtidos nos monitoramentos cinéticos, de fato, apontam para uma possível degradação da colistina no reator. Nos períodos finais do experimento, onde houve inibição mais pronunciada resultando no acúmulo de nitrogênio amoniacal no efluente final, a velocidade máxima de oxidação do nitrogênio amoniacal em função da concentração de substrato pôde ser mantida durante todo o ciclo. Nestes casos, foi possível observar um aumento crescente da velocidade específica, o que aparenta indicar uma redução da inibição ao longo do ciclo (Figura 30). Se considerada a hipótese extrema de degradação completa da colistina antes de cada alimentação, então a concentração final do antimicrobiano no reator logo após a alimentação cairia para cerca de 20% da concentração presente no meio em função do efeito de diluição, e então neste caso a inibição estaria sendo bem mais severa na toxicidade crônica que na aguda. No caso de haver degradação da colistina no reator, o fator TRH teria então uma influência direta nos níveis de toxicidade da colistina nos sistemas de tratamento.

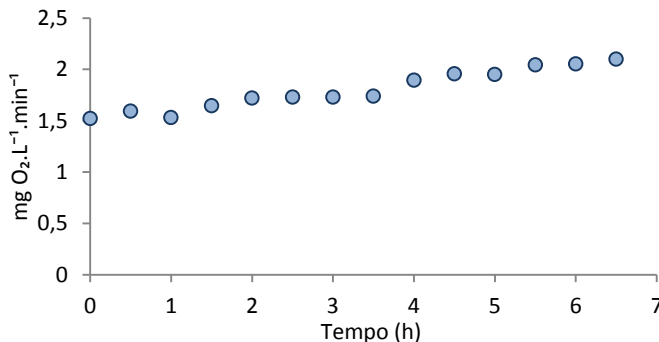


Figura 30: Variação na velocidade global de consumo de oxigênio ao longo de um ciclo monitorado ao final do experimento.

Este aumento da atividade poderia também ser interpretado como o resultado da diminuição da amônia livre (NH_3) ao longo do ciclo e, portanto, redução do seu efeito inibitório sobre a nitrificação. Considerando-se, porém, o pH adotado de 7,5, torna-se improvável que as concentrações de nitrogênio amoniacal observadas no início do ciclo (inferiores a $500 \text{ mg N-NAT.L}^{-1}$) sejam suficientes para causar alguma inibição pela amônia livre. Segundo a equação proposta por Anthonisen *et al.* (1976), a concentração de amônia livre com $500 \text{ mg N-NAT.L}^{-1}$ e pH 7,5 seria de apenas $10,6 \text{ mg N-NH}_3.\text{L}^{-1}$ ($T=25^\circ\text{C}$).

5.2. Toxicidade crônica da colistina sobre a metanogênese

5.2.1. Estabelecimento do reator UASB

Iniciou-se a operação do reator com carga orgânica volumétrica de $1,1 \text{ g DQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ fazendo-se então uma progressão de carga até $4,5 \text{ g DQO.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, conforme descrito no item 4.1.4.2 (p. 42), por um período de 274 dias (Figura 31).

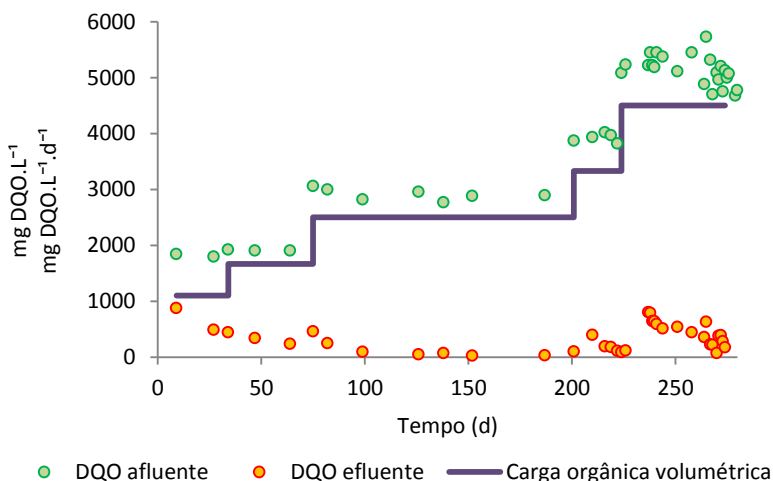


Figura 31: Carga orgânica volumétrica aplicada e DQO afluente e efluente do reator anaeróbio tipo UASB utilizado para aclimação da biomassa metanogênica.

Durante praticamente todo o período de estabelecimento do reator foram mantidos níveis elevados de remoção de DQO, permanecendo após o 50º dia de operação sempre acima de 80%, muitas vezes chegando a praticamente 100%. O pH foi monitorado esporadicamente e durante este período de operação apresentou-se em uma faixa aceitável, sem necessidade de correção ou adição de acidez ou alcalinidade, com valores na alimentação em torno de 6,5 e na saída do reator em torno de 7,5 devido ao aumento na alcalinidade ocasionado pela metanogênese acetoclástica.

5.2.2. Toxicidade crônica da colistina sobre a metanogênese

Não se observou toxicidade relevante da colistina sobre a metanogênese, sendo mantido durante todo o período de operação do reator os altos níveis de remoção mesmo para as concentrações mais elevadas de colistina testadas (Figura 32, Anexo 6).

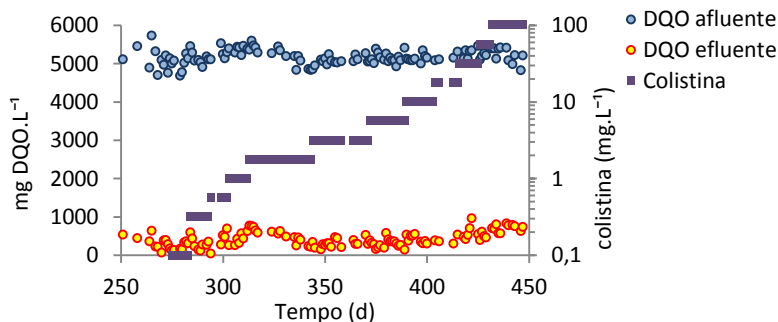


Figura 32: DQO afluyente e efluente do reator anaeróbico tipo UASB e concentração de colistina durante o período de avaliação da toxicidade crônica.

Ocorreu apenas uma pequena redução progressiva na eficiência do reator que pode ser observada a partir do 350º dia de operação, mas que não foi suficiente para comprometer o processo (Figura 33). A pequena perda de eficiência observada entre os dias 310 e 335 foi em razão de quedas de temperatura. Apesar de haver um sistema de aquecimento no reator, o mesmo não foi efetivo para manter a temperatura elevada nos períodos de temperatura mais baixa. Para minimizar o problema, foi adicionada sobre a helicóide de mangueira que revestia o reator uma manta de isolamento térmico. Após esta modificação o reator retomou os níveis elevados de remoção da DQO.

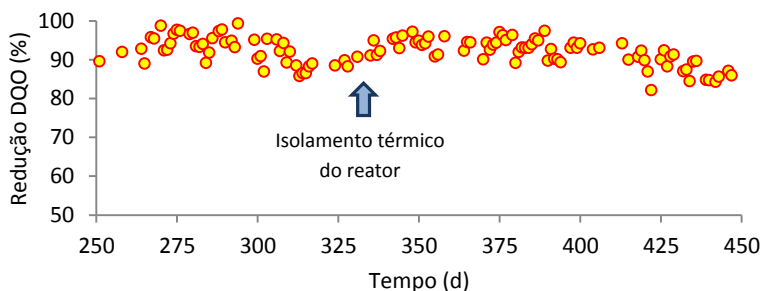


Figura 33: Percentual de redução da DQO durante o período de operação do reator em que foi realizado o teste de toxicidade crônica.

Os valores medidos de produção de biogás apresentaram grande variabilidade, mas pode-se perceber, assim como na remoção de DQO, uma pequena redução na eficiência ao longo do experimento a partir do 350º dia de operação (Figura 34).

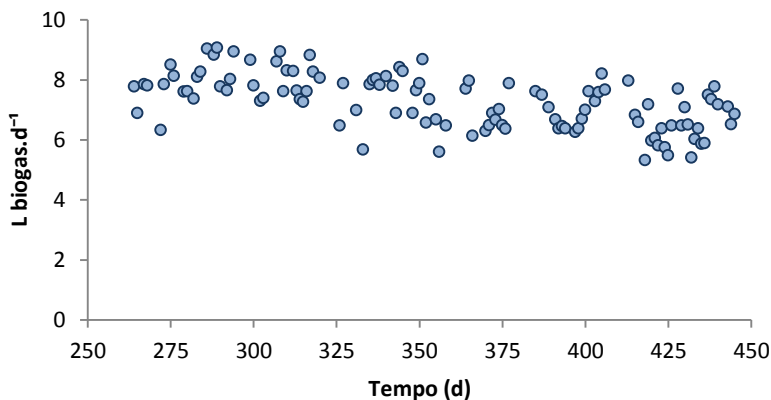
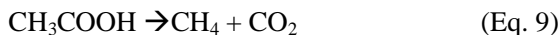


Figura 34: Produção de biogás diária durante o período de operação do reator em que foi realizado o teste de toxicidade crônica.

A produção de biogás não correspondeu ao que era esperado com base na estequiometria genérica da metanogênese acetotrófica. Com base nas reações envolvidas, esperava-se a produção de 0,7 L biogás.g DQO⁻¹, conforme descrito abaixo.

De acordo com a equação 9, 1 mol de acetato produz 2 moles de biogás nas CNTP (44,8 L), sendo 50% CH₄ e 50% CO₂.



Considerando-se que 1 mol de acetato corresponde a uma DQO de 64 g O₂ (Eq. 10), obtêm-se uma relação de 44,8 L de biogás para cada 64 g DQO, ou seja, 0,7 L biogás.g DQO⁻¹.



Portanto, com uma carga diária de 27 g DQO.d⁻¹ esperava-se uma produção de 18,9 L biogás.d⁻¹ (0,84 moles de gás.d⁻¹), cerca de

duas a três vezes maior que os valores de produção observados. Contudo, é interessante ressaltar que a produção média observada manteve-se pouco alterada durante todo o período do teste, corroborando os resultados observados na remoção da DQO que apontam para uma toxicidade muito reduzida da colistina sobre a metanogênese.

Trabalhos anteriores como o de Loftin *et al.* (2005) encontraram inibição significativa sobre a metanogênese em doses comumente encontradas nas lagoas para sulfonamidas, tetraciclina, lincomicina e tartarato de tilosina. No entanto, trabalhos realizados utilizando antibióticos com especificidade sobre gram-negativas (como é a colistina) encontraram inibição fraca a moderada para os antibióticos testados, com valores de CI50 de 24 mg.L⁻¹ a até mais de 1000 mg.L⁻¹ (KÜMMERER, 2009a).

6. Conclusões

- Os testes de toxicidade aguda evidenciaram que apenas as BOA apresentam sensibilidade à colistina, apresentando nos experimentos uma CI-50 de 10,8 e 67 mg colistina.L⁻¹ para a colistina_{com} e colistina_{mp}, respectivamente.
- Não foram observadas nos testes de toxicidade aguda variações relevantes na atividade das BON em função da presença de colistina no meio. Concentrações elevadas, da ordem de 100 a 300 mg colistina.L⁻¹ foram insuficientes para inibir a atividade das BON.
- As concentrações inibitórias encontradas para a colistina apontam para uma potencial toxicidade sobre os processos de nitrificação quando utilizada em concentrações terapêuticas. Nas concentrações mais reduzidas propostas para uso como promotor de crescimento, contudo, provavelmente esta toxicidade seria irrelevante.
- Os testes de avaliação da toxicidade crônica sobre a nitrificação apresentaram valores para CI50 similares àqueles observados na toxicidade aguda, porém, para concentrações mais elevadas a toxicidade crônica mostrou-se mais severa que a toxicidade aguda.
- Efeitos crônicos sobre o desempenho do reator nitrificante (NTF_{tox}) só foram percebidos para concentrações acima de 30 mg colistina.L⁻¹. Porém com 100 mg colistina.L⁻¹ a nitrificação foi comprometida e o reator entrou em uma progressão constante de perda de desempenho comprometendo completamente o processo de nitrificação.
- Não houve toxicidade relevante da colistina sobre a metanogênese em um experimento de longo prazo realizado em um reator do tipo UASB. A presença do antibiótico, mesmo em concentrações de até 100 mg colistina.L⁻¹, não interferiu na quantidade de biogás gerado e nos índices de remoção do acetato.

7. Sugestões para trabalhos futuros

- Avaliação da toxicidade crônica da colistina sobre processos de nitrificação parcial (SHARON);
- Influência de parâmetros operacionais, como concentração de biomassa e pH, sobre a toxicidade da colistina;
- Análise das variações ocasionadas na população microbiana (biodiversidade, desenvolvimento de resistência, etc) em função da exposição prolongada à colistina;
- Análise da degradação físico-química e/ou biológica da colistina em sistemas aeróbios e anaeróbios;
- Verificação da capacidade de adsorção da colistina aos bioossólidos para melhor entendimento dos possíveis mecanismos de remoção da mesma nos sistemas de tratamento;
- Avaliação do potencial sinérgico da colistina no contexto do tratamento de efluentes da suinocultura, onde comumente são encontrados também outros antimicrobianos simultaneamente nos dejetos.

8. Referências Bibliográficas

AARESTRUP, F. M. et al. Trends in the resistance to antimicrobial agents of *Streptococcus suis* isolates from Denmark and Sweden. **Veterinary Microbiology**, v. 63, n. 1, p. 71-80, Aug 28 1998.

ADAMS, C. D. Treatment of antibiotics in swine wastewater. In: AGA, D. S. (Ed.). **Fate of Pharmaceuticals in the Environment and in Water Treatment Systems**. New York: CRC Press, 2008.

ALIGHARDASHI, A. et al. Acute sensitivity of activated sludge bacteria to erythromycin. **Journal of Hazardous Materials**, v. 172, n. 2-3, p. 685-692, Dec 30 2009.

AMANN, R. I. et al. Combination of 16s Ribosomal-Rna-Targeted Oligonucleotide Probes with Flow-Cytometry for Analyzing Mixed Microbial-Populations. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 6, p. 1919-1925, Jun 1990.

AMANN, R. I.; KRUMHOLZ, L.; STAHL, D. A. Fluorescent-Oligonucleotide Probing of Whole Cells for Determinative, Phylogenetic, and Environmental-Studies in Microbiology. **Journal of Bacteriology**, v. 172, n. 2, p. 762-770, Feb 1990.

APHA; AWWA; WEF. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 19ed. Washington, DC.: American Public Health Association, 1995.

BAQUERO, F.; MARTINEZ, J. L.; CANTON, R. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 19, n. 3, p. 260-265, Jun 2008.

BATT, A. L.; KIM, S.; AGA, D. S. Enhanced biodegradation of iopromide and trimethoprim in nitrifying activated sludge. **Environmental Science & Technology**, v. 40, n. 23, p. 7367-7373, Dec 1 2006.

BERENDS, B. R. et al. Human health hazards associated with the administration of antimicrobials to slaughter animals - part II. An assessment of the risks of resistant bacteria in pigs and pork. **Veterinary Quarterly**, v. 23, n. 1, p. 10-21, Jan 2001.

BERNET, N.; SPÉRANDIO, M. Principles of nitrifying processes. In: CERVANTES, F. J. (Ed.). **Environmental Technologies to Treat Nitrogen Pollution**. London, UK: IWA Publishing, 2009. p.23-39.

BITTON, G. **Wastewater Microbiology**. 3. Wiley, 2005. 746

BLUM, D. J. W.; SPEECE, R. E. A Database of Chemical Toxicity to Environmental Bacteria and Its Use in Interspecies Comparisons and Correlations. **Research Journal of the Water Pollution Control Federation**, v. 63, n. 3, p. 198-207, May-Jun 1991.

BOCK, E.; WAGNER, M. Oxidation of Inorganic Nitrogen Compounds as an Energy Source. In: DWORKIN, M.; FALKOW, S., et al (Ed.). **The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria**. Singapura: Springer, v.2, 2006. cap. 1.16, p.457-495.

CAMPOS, J. L. et al. Effect of two broad-spectrum antibiotics on activity and stability of continuous nitrifying system. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 95, n. 1, p. 1-10, Jul 2001.

CARUCCI, A.; CAPPAL, G.; PIREDDA, M. Biodegradability and toxicity of pharmaceuticals in biological wastewater treatment plants. **Journal of Environmental Science and Health Part a-Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering**, v. 41, n. 9, p. 1831-1842, Sep 2006.

CATALDO, D. A. et al. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. . **Comum Soil Sci. Plant Anal.**, v. 6, p. 71-80, 1975.

CHEN, Y.; CHENG, J. J.; CREAMER, K. S. Inhibition of anaerobic digestion process: A review. **Bioresource Technology**, v. In Press, Corrected Proof, 2007.

COSTA, M. M. et al. Caracterização epidemiológica, molecular e perfil de resistência aos antimicrobianos de *Escherichia coli* isoladas de criatórios suínos do sul do Brasil. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 26, p. 5-8, 2006.

DE LA TORRE, A. I. et al. Ecotoxicological evaluation of pig slurry. **Chemosphere**, v. 41, n. 10, p. 1629-1635, 2000.

DENECKE, M.; LIEBIG, T. Effect of carbon dioxide on nitrification rates. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 25, n. 4, p. 249-253, Jan 2003.

DOKIANAKIS, S. N.; KORNAROS, M. E.; LYBERATOS, G. On the effect of pharmaceuticals on bacterial nitrite oxidation. **Water Sci Technol**, v. 50, n. 5, p. 341-6, 2004.

DWORKIN, M. et al. **The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria**. Singapura: Springer, 2006. 1143

EDQVIST, L. E.; PEDERSEN, K. B. **Antimicrobials as growth promoters: resistance to common sense**. Late lesson From Early Warnings: The Precautionary Principle 1896–2000. Environmental Issue Report No. 22. IN: HARREMOËS, P. C.; GEE, D. E. E., *et al*. Copenhagen: European Environment Agency: 93-109 p. 2001.

EMA. Colistin - Summary report. n. EMA/MRL/016/95-Final., p. 6, 2002.

FERNANDES, G. W. et al. Chemical phosphorus removal: a clean strategy for piggery wastewater management in Brazil. **Environmental Technology**, p. 1-7, 2012.

GHOSH, G. C. et al. Antibiotics biodegradation during nitrification: a novel approach to reduce antibiotics load to water environment from nitrogen enriched wastewater. **Proceedings of the Water Environment Federation, WEFTEC: Session 101 through session 115**, p. 7494-7507, 2008.

GRUNDITZ, C.; DALHAMMAR, G. Development of nitrification inhibition assays using pure cultures of *Nitrosomonas* and *Nitrobacter*. **Water Research**, v. 35, n. 2, p. 433-440, Feb 2001.

GUAN, T. Y.; HOLLEY, R. A. Pathogen survival in swine manure environments and transmission of human enteric illness: A review. **Journal of Environmental Quality**, v. 32, n. 2, p. 383-392, Mar-Apr 2003.

HALL, J. E. Nutrient recycling: The European experience - Review. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 12, n. 4, p. 667-674, Jun 1999.

HANCOCK, R. E. W. Peptide antibiotics. **Lancet**, v. 349, n. 9049, p. 418-422, Feb 8 1997.

HAYES, D. J.; JENSEN, H. H.; FABIOSA, J. Technology choice and the economic effects of a ban on the use of antimicrobial feed additives in swine rations. **Food Control**, v. 13, n. 2, p. 97-101, Mar 2002.

INGERSLEV, F.; HALLING-SORENSEN, B. Biodegradability of metronidazole, olaquinox, and tylosin and formation of tylosin degradation products in aerobic soil-manure slurries. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 48, n. 3, p. 311-320, Mar 2001.

JINDAL, A. et al. Antimicrobial use and resistance in swine waste treatment systems. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 12, p. 7813-7820, Dec 2006.

KIM, S. et al. Removal of pharmaceuticals in biological wastewater treatment plants. In: AGA, D. S. (Ed.). **Fate of Pharmaceuticals in the Environment and in Water Treatment Systems**. New York: CRC Press, 2008. cap. Chapter 15, p.349-361.

KÜMMERER, K. Antibiotics in the aquatic environment - A review - Part I. **Chemosphere**, v. 75, n. 4, p. 417-434, 2009a.

KÜMMERER, K. Antibiotics in the aquatic environment - A review - Part II. **Chemosphere**, v. 75, n. 4, p. 435-441, 2009b.

KUNZ, A. **Impactos sobre a disposição inadequada de dejetos de animais sobre a qualidade de águas superficiais e subterrâneas. II simpósio nacional sobre uso da água na agricultura**. Passo Fundo-RS: UFP 2006.

KUNZ, A.; MIELE, M.; STEINMETZ, R. L. R. Advanced swine manure treatment and utilization in Brazil. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 22, p. 5485-5489, Nov 2009.

KUNZ, A.; STEINMETZ, R. L. R.; BORTOLI, M. Separação sólido-líquido em efluentes da suinocultura. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 14, n. 11, p. 1220-1225, 2010.

LI, J. et al. Stability of colistin and colistin methanesulfonate in aqueous media and plasma as determined by high-performance liquid chromatography. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 4, p. 1364-1370, 2003.

LI, J. et al. Antibigrams of multiple-resistant clinical *Acinetobacter baumannii*: promising therapeutic options for treatment of infection with colistin-resistant strains. **Clinical Infectious Diseases**, v. 45, p. 594-598, 2007.

LI, J. et al. Colistin: the re-emerging antibiotic for multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. **Lancet Infectious Diseases**, v. 6, n. 9, p. 589-601, Sep 2006.

LOFTIN, K. A. et al. Effects of ionic strength, temperature, and pH on degradation of selected antibiotics. **Journal of Environmental Quality**, v. 37, n. 2, p. 378-386, Mar-Apr 2008.

LOFTIN, K. A. et al. Inhibition of microbial metabolism in anaerobic lagoons by selected sulfonamides, tetracyclines, lincomycin, and tylosin tartrate. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 24, n. 4, p. 782-788, Apr 2005.

LOUVET, J. N. et al. Adverse effects of erythromycin on the structure and chemistry of activated sludge. **Environ Pollut**, v. 158, n. 3, p. 688-93, Mar 2010.

MACAULEY, J. J. et al. Disinfection of swine wastewater using chlorine, ultraviolet light and ozone. **Water Research**, v. 40, n. 10, p. 2017-2026, 2006.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Brock Biology of Microorganisms** São Paulo: Prentice Hall, 2004. 624p

MASSONE, A. et al. Measurement of ammonium concentration and nitrification rate by a new titrimetric biosensor. **Water Environment Research**, v. 70, n. 3, p. 343-350, May-Jun 1998.

NARIHIRO, T.; SEKIGUCHI, Y. Microbial communities in anaerobic digestion processes for waste and wastewater treatment: a microbiological update. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 18, n. 3, p. 273-278, 2007.

NASNAS, R.; SALIBA, G.; HALLAK, P. The revival of colistin: An old antibiotic for the 21st century. **Pathologie Biologie**, v. 57, n. 3, p. 229-235, May 2009.

NATION, R. L.; LI, J. Colistin in the 21st century. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 22, n. 6, p. 535-543, Dec 2009.

PAREDES, D. et al. New aspects of microbial nitrogen transformations in the context of wastewater treatment - A review. **Engineering in Life Sciences**, v. 7, n. 1, p. 13-25, Feb 2007.

RAUTENBACH, M. et al. Analyses of dose-response curves to compare the antimicrobial activity of model cationic alpha-helical peptides highlights the necessity for a minimum of two activity parameters. **Analytical Biochemistry**, v. 350, n. 1, p. 81-90, Mar 1 2006.

REN, S. J. Assessing wastewater toxicity to activated sludge: recent research and developments. **Environment International**, v. 30, n. 8, p. 1151-1164, Oct 2004.

RITTMANN, B. E.; MCCARTY, P. L. **Environmental biotechnology: principles and applications**. New York: McGraw Hill Book Co, 2001.

SARKAR, S.; DESANTIS, E. R. H.; KUPER, J. Resurgence of colistin use. **American Journal of Health-System Pharmacy**, v. 64, n. 23, p. 2462-2466, Dec 1 2007.

SCHMIDELL NETO, W.; REGINATTO, V. Processos de eliminação de nitrogênio. In: SCHMIDELL, W.; SOARES, H. M., *et al* (Ed.). **Tratamento Biológico de Águas Residuárias**: CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, 2007.

SCHMIDT, I. et al. New concepts of microbial treatment processes for the nitrogen removal in wastewater. **Fems Microbiology Reviews**, v. 27, n. 4, p. 481-492, Oct 2003.

SEGANFREDO, M. A. Os dejetos de suínos são um fertilizante ou um poluente do solo? **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, v. 16, n. 3, p. 129-141, 1999.

SNOEYINK, V. L.; JENKINS, D. **Water Chemistry**. New York: John Wiley & Sons, 1980.

SOU. **Antimicrobial Feed Additives: Report from the Commission on Antimicrobial Feed Additives**. Sweden Ministry of Agriculture (SOU). Stockholm, p.132. 1997

STEINFELD, H. et al. **Livestock's Long Shadow - Environmental Issues and Options**. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2006. 390pp

STEINMETZ, R. L. R. et al. Study of Metal Distribution in Raw and Screened Swine Manure. **Clean-Soil Air Water**, v. 37, n. 3, p. 239-244, Mar 2009.

SYKES, R. M. Biological Wastewater Treatment Processes. In: CHEN, W. F. e LIEW, J. Y. R. (Ed.). **The Civil Engineering Handbook**. 2. New York: CRC Press, 2003. cap. 11,

TABATABAEI, M. et al. Importance of the methanogenic archaea populations in anaerobic wastewater treatments. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 8, p. 1214-1225, Aug 2010.

TANAKA, H.; UZMAN, S.; DUNN, J. Kinetics of nitrification using a fluidized sand bed reactor with attached growth. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 23, p. 1683-1702, 1981.

TOTH, J. D.; FENG, Y. C.; DOU, Z. X. Veterinary antibiotics at environmentally relevant concentrations inhibit soil iron reduction and nitrification. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 43, n. 12, p. 2470-2472, Dec 2011.

VAARA, M. New approaches in peptide antibiotics. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 9, n. 5, p. 571-576, 2009.

VAN HULLE, S. W. H. et al. Influence of temperature and pH on the kinetics of the Sharon nitrification process. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 82, n. 5, p. 471-480, May 2007.

VANOTTI, M. B.; HUNT, P. G. Nitrification treatment of swine wastewater with acclimated nitrifying sludge immobilized in polymer pellets. **Transactions of the Asae**, v. 43, n. 2, p. 405-413, Mar-Apr 2000.

VANOTTI, M. B. et al. Development of environmentally superior treatment system to replace anaerobic swine lagoons in the USA. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 17, p. 3184-3194, 2007.

VERBAENDERT, I. et al. Denitrification in Gram-positive bacteria: an underexplored trait. **Biochemical Society Transactions**, v. 39, p. 254-258, Feb 2011.

VOGEL, A. I. **Análise Inorgânica Quantitativa**. 4.a ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1981.

WANG, H. L.; MAGESAN, G. N.; BOLAN, N. S. An overview of the environmental effects of land application of farm effluents. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, v. 47, n. 4, p. 389-403, Dec 2004.

WANG, S. Y.; GUNSCH, C. K. Effects of selected pharmaceutically active compounds on the ammonia oxidizing bacterium *Nitrosomonas europaea*. **Chemosphere**, v. 82, n. 4, p. 565-572, Jan 2011.

WHITMAN, W. B.; BOWEN, T. L.; BOONE, D. R. The Methanogenic Bacteria. In: DWORKIN, M.; FALKOW, S., et al (Ed.). **The**

Prokaryotes: A handbook on the biology of bacteria. 3rd. Singapore: Springer, v.3, 2006. cap. 9, p.165-207.

ZDRADEK, C. P. **Seleção de linhagens oxidadoras de amônio e remoção de nitrogênio via nitrito em reator descontínuo alimentado (SBR), sob condições de limitação de oxigênio.** 2005. (Doutorado). UFSC.

ANEXO

ANEXO 1
Monitoramento do reator NTT

Dia operação	Data da coleta	pH	N-NAT afluente	N-NAT efluente	N-NO ₂ ⁻ efluente	N-NO ₃ ⁻ efluente	N-NO ₃ ⁻ / (N-NO ₂ ⁻ + N-NO ₃ ⁻)
1	18/08/09	8,3	1054,7	345,9	623,6	28,5	0,04
2	19/08/09	8,2	1054,7	290,0	758,0	15,3	0,02
3	20/08/09	8,1	1144,1	276,6	787,8	15,0	0,02
4	21/08/09	8,1	1144,1	193,9	802,8	19,0	0,02
15	01/09/09	7,6	1094,9	57,5	1026,8	12,7	0,01
16	02/09/09	7,6	1094,9	57,5	1026,8	12,7	0,01
17	03/09/09	7,8	1094,9	73,1	996,9	20,2	0,02
22	08/09/09	8,0	1166,5	245,3	737,4	10,7	0,01
24	10/09/09	7,9	1166,5	176,0	856,9	10,7	0,01
27	13/09/09	-	1166,5	126,8	894,2	14,4	0,02
29	15/09/09	7,6	1108,3	129,0	939,0	14,4	0,02
31	17/09/09	-	1108,3	278,8	759,8	13,4	0,02
32	18/09/09	8,1	1108,3	316,8	692,6	13,4	0,02
35	21/09/09	8,1	1108,3	352,6	707,5	10,7	0,01
37	23/09/09	7,8	1108,3	227,4	804,6	13,6	0,02
38	24/09/09	-	1108,3	233,3	737,4	13,5	0,02
42	28/09/09	-	1108,3	303,7	729,9	12,7	0,02
44	30/09/09	8,1	870,5	259,0	662,7	14,6	0,02
46	02/10/09	-	870,5	257,9	543,3	14,3	0,03
49	05/10/09	-	1052,4	249,0	580,6	12,3	0,02
53	09/10/09	-	1052,4	308,2	603,0	13,4	0,02
57	13/10/09	-	1052,4	282,5	677,7	12,3	0,02
60	16/10/09	8,2	1052,4	225,5	729,9	8,1	0,01
64	20/10/09	7,9	1048,0	161,8	707,5	16,3	0,02
65	21/10/09	7,9	1092,7	152,8	767,3	62,3	0,08

ANEXO 1
Monitoramento do reator NTT

Dia operação	Data da coleta	pH	N-NAT afluente	N-NAT efluente	N-NO ₂ ⁻ efluente	N-NO ₃ ⁻ efluente	$\text{N-NO}_3^- / (\text{N-NO}_2^- + \text{N-NO}_3^-)$
67	23/10/09	8,1	963,0	178,5	722,5	40,9	0,05
70	26/10/09	8,2	963,0	215,4	700,1	33,6	0,05
72	28/10/09	7,8	1045,7	94,7	827,0	39,0	0,05
74	30/10/09	-	1045,7	56,7	924,1	38,2	0,04
78	03/11/09	7,4	1128,5	63,4	909,2	38,4	0,04
79	04/11/09	7,5	1097,2	91,0	984,7	17,0	0,02
81	06/11/09	-	1074,8	63,4	917,5	15,8	0,02
85	10/11/09	-	1101,6	82,1	966,1	14,7	0,02
93	18/11/09	-	1056,9	117,8	910,1	17,7	0,02
100	25/11/09	-	1061,4	93,2	939,9	18,2	0,02
109	04/12/09	-	906,3	101,1	861,5	17,7	0,02
112	07/12/09	-	1015,9	49,0	1010,9	19,3	0,02
116	11/12/09	-	1015,9	54,9	1029,6	19,0	0,02
120	15/12/09	8,2	1077,4	168,1	895,1	10,7	0,01
122	17/12/09	7,0	1080,7	234,0	786,9	16,6	0,02
126	21/12/09	8,2	1129,9	221,7	805,5	12,9	0,02
133	28/12/09	7,2	1110,6	36,7	992,2	14,6	0,01
139	03/01/10	-	1110,6	110,0	943,7	16,2	0,02
142	06/01/10	7,8	1061,4	122,8	936,2	13,0	0,01
148	12/01/10	7,3	1101,6	58,0	1052,0	17,6	0,02
150	14/01/10	7,1	1074,8	25,0	984,7	4,9	0,00
154	18/01/10	7,3	1150,8	57,4	917,5	19,0	0,02
156	20/01/10	8,1	1141,9	200,5	805,5	14,9	0,02
157	21/01/10	8,0	1115,0	244,1	775,7	18,7	0,02
161	25/01/10	8,2	1094,9	372,7	659,9	11,3	0,02

ANEXO 1
Monitoramento do reator NTT

Dia operação	Data da coleta	pH	N-NAT afluente	N-NAT efluente	N-NO ₂ ⁻ efluente	N-NO ₃ ⁻ efluente	N-NO ₃ ⁻ / (N-NO ₂ ⁻ + N-NO ₃ ⁻)
168	01/02/10	-	1094,9	333,5	730,9	15,7	0,02
170	03/02/10	7,8	1054,7	114,4	936,2	17,5	0,02
175	08/02/10	7,2	1157,5	37,3	1003,4	16,1	0,02
177	10/02/10	7,3	1065,9	56,3	992,2	24,7	0,02
184	17/02/10	7,4	1083,7	51,3	977,3	14,3	0,01
186	19/02/10	6,9	1077,0	16,6	1037,0	17,3	0,02
199	04/03/10	7,4	1016,7	41,8	951,1	14,5	0,01
203	08/03/10	7,5	1110,6	75,3	906,3	17,2	0,02
210	15/03/10	7,2	1092,7	39,5	936,2	22,9	0,02
213	18/03/10	7,2	1150,8	11,6	1044,5	25,4	0,02
217	22/03/10	7,9	1108,3	225,7	842,9	20,2	0,02
224	29/03/10	8,0	1041,3	167,0	801,8	16,1	0,02
226	31/03/10	-	1077,0	150,8	842,9	18,1	0,02
231	05/04/10	7,9	1110,6	173,7	817,7	28,0	0,03
238	12/04/10	7,6	1034,6	115,5	892,4	17,8	0,02
241	15/04/10	7,5	1097,2	102,1	922,3	29,4	0,03
245	19/04/10	7,7	1097,2	153,6	907,3	27,7	0,03
252	26/04/10	6,1	1088,2	285,5	787,8	17,5	0,02
253	27/04/10	-	1048,0	307,8	772,9	17,0	0,02
261	05/05/10	8,3	1007,7	387,2	663,7	13,0	0,02
262	06/05/10	8,2	1063,6	306,2	671,1	15,8	0,02
263	07/05/10	8,3	1005,5	281,0	544,2	17,8	0,03
267	11/05/10	-	1083,7	246,3	820,5	8,5	0,01
268	12/05/10	-	1083,7	187,6	872,7	17,1	0,02
273	17/05/10	8,7	1025,6	423,5	473,2	9,2	0,02

ANEXO 1
Monitoramento do reator NTT

Dia operação	Data da coleta	pH	N-NAT afluente	N-NAT efluente	N-NO ₂ ⁻ efluente	N-NO ₃ ⁻ efluente	N-NO ₃ ⁻ / (N-NO ₂ ⁻ + N-NO ₃ ⁻)
275	19/05/10	8,6	1025,6	417,9	469,5	9,7	0,02
279	23/05/10	8,1	1030,1	186,0	757,0	17,3	0,02
281	25/05/10	8,1	1030,1	225,7	790,6	14,6	0,02
283	27/05/10	8,0	1097,2	164,0	865,3	10,1	0,01
289	02/06/10	8,0	1092,7	171,8	857,8	17,1	0,02
291	04/06/10	7,9	1079,3	148,3	906,3	19,2	0,02
303	16/06/10	7,8	1092,7	113,1	928,7	19,0	0,02
308	21/06/10	7,8	1056,9	101,4	943,7	17,5	0,02
317	30/06/10	7,9	1099,4	170,1	805,5	14,9	0,02
318	01/07/10	7,8	1108,3	144,1	824,2	14,7	0,02
322	05/07/10	7,8	1106,1	119,3	891,4	11,3	0,01
324	07/07/10	7,8	967,5	128,2	876,5	15,9	0,02
328	11/07/10	7,8	963,0	132,1	850,3	42,2	0,05
331	14/07/10	7,9	967,5	162,9	839,1	36,8	0,04
333	16/07/10	7,9	1025,6	166,8	775,7	18,5	0,02
340	23/07/10	7,8	994,3	141,1	809,3	17,7	0,02
342	25/07/10	7,8	1043,5	139,9	835,4	17,0	0,02
344	27/07/10	7,8	1065,9	129,9	854,1	18,0	0,02
346	29/07/10	7,8	1065,9	130,4	839,1	14,7	0,02
347	30/07/10	7,8	1025,6	147,2	813,0	15,8	0,02
348	31/07/10	7,8	1074,8	139,9	816,7	15,2	0,02
350	02/08/10	7,9	1101,6	149,4	850,3	14,2	0,02
353	05/08/10	8,1	1012,2	188,6	813,0	17,7	0,02
356	08/08/10	8,0	1043,5	203,7	775,7	18,2	0,02
361	13/08/10	8,0	1039,0	267,9	779,4	17,0	0,02

ANEXO 1
Monitoramento do reator NTT

Dia operação	Data da coleta	pH	N-NAT afluente	N-NAT efluente	N-NO ₂ ⁻ efluente	N-NO ₃ ⁻ efluente	N-NO ₃ ⁻ / (N-NO ₂ ⁻ + N-NO ₃ ⁻)
365	17/08/10	7,8	976,4	243,4	813,0	18,0	0,02
367	19/08/10	7,8	1065,9	231,1	869,0	18,7	0,02
375	27/08/10	7,7	967,5	205,9	865,3	19,0	0,02
380	01/09/10	7,8	945,1	190,2	842,9	19,9	0,02
388	09/09/10	-	989,8	242,2	794,3	18,0	0,02
390	11/09/10	-	967,5	237,2	790,6	17,3	0,02
393	14/09/10	-	1056,9	251,7	801,8	14,9	0,02
399	20/09/10	-	1065,9	250,6	805,5	13,9	0,02
411	02/10/10	7,7	967,5	205,9	865,3	19,0	0,02
428	19/10/10	7,8	967,5	243,4	813,0	18,0	0,02
436	27/10/10	8,0	1015,5	425,0	484,4	6,4	0,01
455	15/11/10	-	-	271,3	618,9	13,5	0,02
456	16/11/10	7,7	1085,5	256,2	641,3	14,6	0,02
462	22/11/10	-	1038,8	282,5	600,2	14,2	0,02
470	30/11/10	-	1024,8	433,4	469,5	9,9	0,02
507	06/01/11	8,3	-	412,7	413,5	9,4	0,02
511	10/01/11	8,5	1052,8	232,7	600,2	14,6	0,02
519	18/01/11	8,2	1085,5	269,6	518,0	10,4	0,02
521	20/01/11	8,1	1003,3	206,8	633,8	14,7	0,02
525	24/01/11	8,1	-	172,4	719,7	14,7	0,02
528	27/01/11	8,0	-	176,3	715,9	14,4	0,02
543	11/02/11	-	967,5	203,9	670,5	16,8	0,02
545	13/02/11	8,1	1025,6	141,3	639,8	13,2	0,02
551	19/02/11	8,2	994,3	164,7	622,7	-	-
555	23/02/11	-	-	-	-	28,9	-

ANEXO 1
Monitoramento do reator NTT

Dia operação	Data da coleta	pH	N-NAT afluente	N-NAT efluente	N-NO ₂ ⁻ efluente	N-NO ₃ ⁻ efluente	N-NO ₃ ⁻ / (N-NO ₂ ⁻ + N-NO ₃ ⁻)
557	25/02/11	-	1043,5	147,0			
562	02/03/11	-	-	155,8	694,4	11,3	0,02
563	03/03/11	-	-	172,6	670,5	12,5	0,02
591	31/03/11	-	1001,0	217,0	580,8		
592	01/04/11	-	-	316,8	510,1	16,5	0,03
594	03/04/11	-	-	366,0	462,3	13,2	0,03
595	04/04/11	-	-	376,0	397,5	11,8	0,03
596	05/04/11	-	998,8	406,2	421,4	10,6	0,02
598	07/04/11	-	-	501,2	353,1	10,9	0,03
604	13/04/11	8,4	-	590,7	305,4	7,6	0,02
605	14/04/11	8,3	-	624,2	288,3	4,5	0,02
606	15/04/11	8,4	998,8	604,1	233,7	6,1	0,03
609	18/04/11	-	-	703,6	216,6	5,7	0,03
610	19/04/11	-	1006,1	600,7	241,4	2,6	0,01
611	20/04/11	-	-	711,4	325,0	6,6	0,02
616	25/04/11	-	-	528,1	415,4	12,5	0,03
617	26/04/11	-	-	457,6	355,7	3,5	0,01
618	27/04/11	8,4	912,1	462,1	346,3	6,6	0,02
619	28/04/11	-	-	467,7	418,8	10,1	0,02
620	29/04/11	-	-	501,2	408,6	8,8	0,02
623	02/05/11	8,4	-	471,0	479,4	10,1	0,02
624	03/05/11	8,4	-	496,8	455,5	9,5	0,02
627	06/05/11	8,3	954,8	426,3	543,4	14,4	0,03
629	08/05/11	8,3	1006,1	364,8	519,5	19,0	0,04
630	09/05/11	-	-	398,4	548,5	14,2	0,03

ANEXO 1
Monitoramento do reator NTT

Dia operação	Data da coleta	pH	N-NAT afluente	N-NAT efluente	N-NO ₂ ⁻ efluente	N-NO ₃ ⁻ efluente	N-NO ₃ ⁻ / (N-NO ₂ ⁻ + N-NO ₃ ⁻)
631	10/05/11	8,3	894,1	358,7	452,1	14,6	0,03
633	12/05/11	8,3	910,5	471,0	489,6	15,1	0,03
634	13/05/11	8,4	1034,1	435,8	404,3	6,6	0,02
637	16/05/11	8,5	-	391,7	441,8	8,8	0,02
638	17/05/11	8,5	-	380,5	407,7	8,8	0,02
640	19/05/11	-	-	414,0	377,0	6,9	0,02
641	20/05/11	8,4	-	405,6	380,4	8,3	0,02
644	23/05/11	-	-	433,6	424,8	9,2	0,02
647	26/05/11	8,5	1011,1	417,9	404,3	0,7	0,00
651	30/05/11	8,5	-	422,4	445,3	8,8	0,02
652	31/05/11	8,3	-	340,2	493,0	10,8	0,02
659	07/06/11	8,0	-	156,9	607,3	9,9	0,02
655	03/06/11	-	-	200,5	578,3	15,2	0,03
658	06/06/11	-	-	178,1	603,9	18,7	0,03
665	13/06/11	-	-	210,0	643,2	12,8	0,02
672	20/06/11	7,5	1141,5	30,0	800,1	26,1	0,03
673	21/06/11	7,4	1024,8	32,3	791,6	14,9	0,02
674	22/06/11	7,8	1062,1	119,5	680,7	16,8	0,02
680	28/06/11	-	1127,5	274,8	586,9	3,8	0,01
688	06/07/11	8,6	1071,5	449,8	453,8	2,8	0,01
690	08/07/11	8,5	1094,8	368,2	523,7	24,6	0,04
694	12/07/11	-	1118,1	325,7	581,8	39,3	0,06
695	13/07/11	8,6	-	374,9	540,8	37,4	0,06
696	14/07/11	-	-	387,2	527,2	24,2	0,04
708	26/07/11	8,2	1015,5	146,8	752,4	18,4	0,02

ANEXO 1
Monitoramento do reator NTT

Dia operação	Data da coleta	pH	N-NAT afluente	N-NAT efluente	N-NO ₂ ⁻ efluente	N-NO ₃ ⁻ efluente	N-NO ₃ ⁻ / (N-NO ₂ ⁻ + N-NO ₃ ⁻)
709	27/07/11	8,1	1001,5	148,0	759,2	22,7	0,03
710	28/07/11	-	1029,5	136,2	752,4	21,1	0,03
714	01/08/11	-	1015,5	139,0	762,6	24,2	0,03
717	04/08/11	8,2	1052,8	212,8	687,5	7,5	0,01
722	09/08/11	8,4	1085,5	234,6	605,6	22,0	0,04
728	15/08/11	-	1038,8	75,3	660,2	28,6	0,04
731	18/08/11	8,6	1099,5	281,6	544,2	34,3	0,06
735	22/08/11	-	1024,8	279,3	539,1	10,4	0,02
736	23/08/11	-	1132,1	305,0	515,2	21,6	0,04
742	29/08/11	-	1020,1	440,9	426,5	3,0	0,01
749	05/09/11	-	-	559,4	329,2	14,2	0,04
750	06/09/11	-	-	563,8	370,2	14,7	0,04
751	07/09/11	-	-	550,4	353,1	12,0	0,03
757	13/09/11	-	1188,1	190,4	631,2	34,8	0,05
758	14/09/11	-	-	135,7	718,2	28,6	0,04
760	16/09/11	-	-	126,2	706,3	27,3	0,04
763	19/09/11	-	-	108,3	738,7	33,4	0,04
765	21/09/11	8,1	-	206,7	595,4	24,1	0,04
771	27/09/11	-	1122,8	365,4	375,3	24,1	0,06
772	28/09/11	-		406,2	397,5	17,3	0,04
777	03/10/11		-	364,3	389,0	23,5	0,06

ANEXO 2

Resultados dos testes de toxicidade aguda sobre as BOA (Bactérias Oxidadoras de Amônia)

Colistina_{com} - Experimento 1

Log [colistina] (mg.L ⁻¹)	[colistina] (mg.L ⁻¹)	[N-NO ₂] (mg.L ⁻¹)					Velocidade (mg N-NO ₂ .h ⁻¹)	Inibição
		h1	h2	h3	h4	h5		
neg	0	34,72	57,12	97,45	141,88	171,75	42,38	0,0%
0	1	34,35	58,62	93,34	128,81	165,03	35,10	17,2%
0,5	3,16	33,23	54,51	80,65	118,36	155,69	31,92	24,7%
1	10	35,84	54,51	72,43	102,30	131,42	23,90	43,6%
1,5	31,6	35,47	49,66	63,84	73,55	82,14	11,95	71,8%
2	100	35,47	42,19	41,07	42,94	42,19	0,37	99,1%

ANEXO 2

Resultados dos testes de toxicidade aguda sobre as BOA (Bactérias Oxidadoras de Amônia)

Colistina_{com} - Experimento 2

Log [colistina] (mg.L ⁻¹)	[colistina] (mg.L ⁻¹)	[N-NO ₂] (mg.L ⁻¹)				Velocidade (mg N-NO ₂ .h ⁻¹)	Inibição
		h1	h2	h3	h4		
neg	0	13,57	24,52	37,34	54,88	15,18	0,0%
-1	0,1	13,19	24,64	37,71	53,14	14,25	6,1%
-0,5	0,32	13,69	23,90	34,35	51,90	14,00	7,8%
0	1	17,67	22,77	36,22	51,40	14,31	5,7%
0,5	3,16	14,31	25,76	40,32	55,38	14,81	2,5%*
1	10	13,69	21,28	27,26	34,97	6,84	54,9%
1,5	31,6	10,33	13,44	17,80	20,29	3,42	77,5%
2	100	7,34	9,21	8,59	9,46	0,12	99,2%

ANEXO 2

Resultados dos testes de toxicidade aguda sobre as BOA (Bactérias Oxidadoras de Amônia)

Colistina_{com} - Média dos experimentos

Log [colistina] (mg.L ⁻¹)	[colistina] (mg.L ⁻¹)	Vel. 1	Inib. 1	Vel. 2	Inib. 2	Inibição média
neg	0	42,38	0,0%	15,18	0,0%	0,0%
-1	0,1	-	-	14,25	6,1%	6,1%
-0,5	0,32	-	-	14,00	7,8%	7,8%
0	1	35,10	17,2%	14,31	5,7%	11,5%
0,5	3,16	31,92	24,7%	14,81	-	24,7%
1	10	23,90	43,6%	6,84	54,9%	49,3%
1,5	31,6	11,95	71,8%	3,42	77,5%	74,6%
2	100	0,37	99,1%	0,12	99,2%	99,1%

ANEXO 2

Resultados dos testes de toxicidade aguda sobre as BOA (Bactérias Oxidadoras de Amônia)

Colistina_{mp} - Experimento 1

Log [colistina] (mg.L ⁻¹)	[colistina] (mg.L ⁻¹)	[N-NO ₂] (mg.L ⁻¹)						[N-NO ₃] (mg.L ⁻¹)						Velocidade (mg N-NO _x .h ⁻¹)	Inibição
		[N-NO ₂] (mg.L ⁻¹)			[N-NO ₃] (mg.L ⁻¹)			[N-NO ₃] (mg.L ⁻¹)			[N-NO _x] (mg.L ⁻¹)				
		h1	h2	h3	h1	h2	h3	h1	h2	h3	h1	h2	h3		
neg	0	14,4	31,3	54,4	3,6	7,4	12,4	18,0	38,7	66,8	24,4	0,0%			
-0,5	0,32	16,3	33,5	57,4	4,5	7,6	12,7	20,9	41,2	70,1	24,6	-0,7%			
0	1	16,0	35,0	55,9	4,5	8,5	13,2	20,5	43,5	69,1	24,3	0,5%			
0,5	3,16	16,3	38,4	59,6	4,7	8,7	13,2	21,0	47,0	72,8	25,9	-6,0%			
1	10	15,6	33,5	54,8	4,7	7,6	13,2	20,3	41,2	68,0	23,8	2,4%			
1,5	31,6	14,8	34,3	55,5	5,6	9,0	15,9	20,4	43,3	71,5	25,5	-4,6%*			
2	100	10,0	18,2	24,5	4,9	10,1	18,9	14,9	28,3	43,4	14,3	41,5%			
2,5	316,23	2,5	3,3	2,9	3,0	3,7	5,2	5,5	6,9	8,1	1,3	94,6%			

ANEXO 2
Resultados dos testes de toxicidade aguda sobre as BOA (Bactérias Oxidadoras de Amônia)

Colistina_{mp} - Experimento 2

Log [colistina] (mg.L ⁻¹)	[colistina] (mg.L ⁻¹)	[N-NO ₂] ⁻ (mg.L ⁻¹)			[N-NO ₃] ⁻ (mg.L ⁻¹)			[N-NO _x] ⁻ (mg.L ⁻¹)			Velocidade (mg N-NO _x .h ⁻¹)	Inibição
		h1	h2	h3	h1	h2	h3	h1	h2	h3		
neg	0	17,8	40,2	67,4	6,4	12,5	20,9	24,3	52,7	88,4	32,0	0,0%
-0,5	0,32	17,8	37,6	67,4	6,6	13,2	21,6	24,5	50,7	89,1	32,3	-0,8%
0	1	16,1	31,3	52,8	5,7	10,6	16,5	21,8	41,9	69,2	23,7	26,0%*
0,5	3,16	17,5	35,2	65,0	6,4	3,5	18,5	24,0	38,7	83,6	29,8	7,0%
1	10	15,2	30,1	50,7	5,4	10,2	15,8	20,6	40,3	66,5	23,0	28,4%
1,5	31,6	16,7	26,8	37,3	6,8	14,2	27,2	23,4	41,0	64,4	20,5	36,0%
2	100	6,8	9,5	8,6	6,9	12,1	23,7	13,7	21,6	32,3	9,3	71,1%
2,5	316,23	1,7	0,8	0,8	3,0	3,7	4,7	4,7	4,5	5,5	0,4	98,7%

ANEXO 2

Resultados dos testes de toxicidade aguda sobre as BOA (Bactérias Oxidadoras de Amônia)

Colistina_{amp} - Média dos experimentos

Log [colistina] (mg.L ⁻¹)	[colistina] (mg.L ⁻¹)	Vel. 1	Inib. 1	Vel. 2	Inib. 2	Inibição média
neg	0	24,4	0,0%	32,0	0,0%	0,0%
-0,5	0,32	24,6	0,0%	32,3	0,0%	0,0%
0	1	24,3	0,5%	23,7	-	0,5%
0,5	3,2	25,9	0,0%	29,8	7,0%	3,5%
1	10	23,8	2,4%	23,0	28,4%	15,4%
1,5	31,6	25,5	-	20,5	36,0%	36,0%
2	100	14,3	41,5%	9,3	71,1%	56,3%
2,5	316	1,31	94,6%	0,4	98,7%	96,7%

ANEXO 3

Ensaio cinéticos para avaliação da toxicidade crônica sobre a nitrificação

Cinética 1 12/09/11

Tempo (h)	mgO ₂ .gSSV ⁻¹ .min ⁻¹	mgO ₂ .L ⁻¹	ng N-NH ₃ .L ⁻¹
0,0	1,89	5,47	213,92
0,5	2,39	4,23	
1,0	2,42	4,09	156,09
1,5	2,51	3,97	
2,0	2,42	4,00	91,09
2,5	2,32	4,19	
3,0	2,08	4,55	49,50
3,5	1,86	4,95	
4,0	1,69	5,52	24,30
4,5	1,24	6,12	
5,0	0,84	7,02	14,47
5,5	0,42	7,55	
6,0	0,18	7,85	7,09
6,5	0,11	8,01	1,50

Cinética 2 15/09/11

Tempo (h)	mgO ₂ .gSSV ⁻¹ .min ⁻¹	mgO ₂ .L ⁻¹	ng N-NH ₃ .L ⁻¹
0,0	1,53	4,30	244,47
1,0		2,77	186,79
2,0		2,55	122,39
3,0	2,40		71,42
4,0	1,36	5,20	27,66
4,5	0,55	7,27	
5,0	0,14	8,15	3,06
5,5	0,10	8,40	
6,0	0,06	8,43	2,17

ANEXO 3

Ensaio cinéticos para avaliação da toxicidade crônica sobre a nitrificação

Cinética 3 20/09/11

Tempo (h)	mgO ₂ .gSSV ⁻¹ .min ⁻¹	mgO ₂ .L ⁻¹	ng N-NH ₃ .L ⁻¹
0,0	3,24	4,50	312,89
0,5	3,66	4,00	
1,0	3,66	4,00	249,84
1,5	3,66	4,00	
2,0	3,66	4,00	
2,5	3,66	4,00	172,03
3,0	3,66	4,00	148,33
3,5	3,66	4,20	
4,0	3,21	4,40	108,15
4,5	2,95	4,90	
5,0	2,58	5,40	70,36
5,5	2,36	6,00	
6,0	1,99	6,30	45,77
6,5	1,80	6,30	
7,0			31,24

Cinética 4 26/09/11

Tempo (h)	mgO ₂ .gSSV ⁻¹ .min ⁻¹	mgO ₂ .L ⁻¹	ng N-NH ₃ .L ⁻¹
0,0	2,78	4,70	353,86
0,5	3,36	4,10	
1,0	3,44	3,75	330,25
1,5	3,46	3,80	
2,0	2,56	4,20	280,49
2,5	3,18	4,10	
3,0	3,29	4,10	247,18
3,5	3,31	4,00	
4,0	3,36	4,10	206,23
4,5	3,44	4,25	
5,0	3,44	4,30	168,71
5,5	3,48	4,40	
6,0	3,18	4,60	133,50

ANEXO 3

Ensaio cinéticos para avaliação da toxicidade crônica sobre a nitrificação

Cinética 5 28/09/11

Tempo (h)	mgO ₂ .gSSV ⁻¹ .min ⁻¹	mgO ₂ .L ⁻¹	ng N-NH ₃ .L ⁻¹
0,0	2,91	4,80	277,54
0,5	3,43	4,20	
1,0	3,49	4,00	243,97
1,5	3,38	4,10	
2,0	3,43	4,10	193,21
2,5	3,23	4,20	
3,0	3,15	4,30	132,92
3,5	3,15	4,50	
4,0	2,91	4,90	61,61
4,5	2,45	5,30	
5,0	2,02	5,80	38,84
5,5	1,42	6,40	
6,0	1,25	7,10	22,61
6,5	0,74	7,50	22,82

Cinética 6 13/10/11

Tempo (h)	mgO ₂ .gSSV ⁻¹ .min ⁻¹	mgO ₂ .L ⁻¹	ng N-NH ₃ .L ⁻¹
0,0	2,79	5,00	248,05
0,5	3,06	4,50	
1,0	3,12	4,40	185,00
1,5	3,12	4,40	
2,0	3,03	4,60	124,63
2,5	2,84	5,00	
3,0	2,47	5,50	65,15
3,5	1,97	6,00	
4,0	1,34	6,80	30,34
4,5	0,91	7,30	
5,0	0,39	7,70	15,58
5,5	0,22	8,00	
6,0	0,11	8,10	1,50

ANEXO 3

Ensaio cinéticos para avaliação da toxicidade crônica sobre a nitrificação

Cinética 7 14/10/11

Tempo (h)	$\text{mgO}_2 \cdot \text{gSSV}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$	$\text{mgO}_2 \cdot \text{L}^{-1}$	$\text{ng N-NH}_3 \cdot \text{L}^{-1}$
0,0	3,09	5,10	247,16
0,5	3,50	4,60	
1,0	3,24	4,80	180,97
1,5	3,15	4,90	
2,0	2,97	5,10	123,74
2,5	2,88	5,50	
3,0	2,81	5,70	62,92
3,5	2,18	6,10	
4,0	1,48	6,70	30,79
4,5	0,84	7,30	
5,0	0,39	7,70	15,58
5,5	0,17	7,90	
6,0	0,09	8,00	4,85

Cinética 8 21/10/11

Tempo (h)	$\text{mgO}_2 \cdot \text{gSSV}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$	$\text{mgO}_2 \cdot \text{L}^{-1}$	$\text{ng N-NH}_3 \cdot \text{L}^{-1}$
0,0	1,93	5,70	242,39
0,5	1,99	5,40	
1,0	2,19	5,40	
1,5	2,02	5,50	172,33
2,0			
2,5	2,02	5,50	115,09
3,0	1,84	5,70	
3,5	1,63	6,00	73,95
4,0	1,41	6,20	
4,5	1,19	6,50	44,13
5,0	0,90	6,80	
5,5	0,55	7,10	30,57
6,0	0,38	7,40	
6,5	0,22	7,50	12,68

ANEXO 3

Ensaio cinéticos para avaliação da toxicidade crônica sobre a nitrificação

Cinética 9 17/11/11

Tempo (h)	mgO ₂ .gSSV ⁻¹ .min ⁻¹	mgO ₂ .L ⁻¹	ng N-NH ₃ .L ⁻¹
0,0	1,79	5,50	241,49
0,5	1,98	5,25	
1,0	1,98	5,15	192,15
1,5	2,13	5,10	
2,0	2,02	5,15	148,18
2,5	1,99	5,20	
3,0	1,88	5,25	102,87
3,5	1,77	5,40	
4,0	1,58	5,60	62,31
4,5	1,37	6,00	
5,0	1,00	6,30	36,83
5,5	0,79	6,70	

Cinética 10 21/11/11

Tempo (h)	mgO ₂ .gSSV ⁻¹ .min ⁻¹	mgO ₂ .L ⁻¹	ng N-NH ₃ .L ⁻¹
0,0	1,93	4,95	273,09
0,5	2,07	4,75	
1,0	1,71	4,85	220,62
1,5	1,92	5,00	
2,0	1,78	5,20	163,09
2,5	1,70	5,40	
3,0	1,63	5,60	116,88
3,5	1,42	5,80	
4,0	1,31	6,05	75,73
4,5	0,98	6,25	
5,0	0,81	6,50	42,64

ANEXO 3

Ensaios cinéticos para avaliação da toxicidade crônica sobre a nitrificação

Cinética 11 24/11/11

Tempo (h)	mgO ₂ .gSSV ⁻¹ .min ⁻¹	mgO ₂ .L ⁻¹	ng N-NH ₃ .L ⁻¹
0,0	1,61	5,50	251,63
0,5	1,78	5,40	
1,0	1,71	5,45	205,57
1,5	1,74	5,40	
2,0	1,71	5,45	165,77
2,5	1,62	5,55	
3,0	1,59	5,60	125,97
3,5	1,51	5,70	
4,0	1,42	5,85	91,83
4,5	1,32	6,00	
5,0	1,17	6,20	61,42
5,5	1,02	6,40	
6,0	0,86	6,65	39,51
6,5	0,74	6,85	29,00

Cinética 12 28/11/11

Tempo (h)	mgO ₂ .gSSV ⁻¹ .min ⁻¹	mgO ₂ .L ⁻¹	ng N-NH ₃ .L ⁻¹
0,0	1,77	5,50	304,40
0,5	1,84	5,50	
1,0	1,81	5,50	256,10
1,5	1,77	5,50	
2,0	1,85	5,50	218,09
2,5	1,83	5,50	
3,0	1,74	5,60	170,69
3,5	1,67	5,70	
4,0	1,57	5,85	128,65
4,5	1,47	6,00	
5,0	1,36	6,15	92,88
5,5	1,24	6,30	
6,0	1,10	6,50	66,50
6,5	0,96	6,70	50,40

ANEXO 3

Ensaio cinéticos para avaliação da toxicidade crônica sobre a nitrificação

Cinética 13 05/12/11

Tempo (h)	mgO ₂ .gSSV ⁻¹ .min ⁻¹	mgO ₂ .L ⁻¹	ng N-NH ₃ .L ⁻¹
0,0	1,20	5,20	252,52
0,5	1,34	5,40	
1,0	1,34	5,50	206,02
1,5	1,34	5,65	
2,0	1,29	5,70	173,82
2,5	1,25	5,70	
3,0	1,17	5,85	133,13
3,5	1,12	6,00	
4,0	1,03	6,10	97,80
4,5	0,95	6,20	
5,0	0,91	6,30	68,73
5,5	0,77	6,50	
6,0	0,68	6,70	47,27
6,5	0,61	6,80	36,54

Cinética 14 06/12/11

Tempo (h)	mgO ₂ .gSSV ⁻¹ .min ⁻¹	mgO ₂ .L ⁻¹	ng N-NH ₃ .L ⁻¹
0,0	1,29	5,70	240,90
0,5	1,34	5,60	
1,0	1,32	5,65	206,91
1,5	1,30	5,70	
2,0	1,27	5,80	151,01
2,5	1,24	5,95	
3,0	1,17	6,10	115,69
3,5	1,10	6,15	
4,0	1,02	6,25	83,49
4,5	0,94	6,35	
5,0	0,83	6,40	62,92

ANEXO 3

Ensaio cinéticos para avaliação da toxicidade crônica sobre a nitrificação

Cinética 15 20/12/11

Tempo (h)	mgO ₂ .gSSV ⁻¹ .min ⁻¹	mgO ₂ .L ⁻¹	ng N-NH ₃ .L ⁻¹
0,0	1,16	6,10	296,35
0,5	1,21	6,15	
1,0	1,25	6,10	261,47
1,5	1,27	6,00	
2,0	1,30	5,95	224,80
2,5	1,38	5,90	
3,0	1,41	5,80	175,61
3,5	1,41	5,70	
4,0		5,65	128,21

Cinética 16 05/01/12

Tempo (h)	mgO ₂ .gSSV ⁻¹ .min ⁻¹	mgO ₂ .L ⁻¹	ng N-NH ₃ .L ⁻¹
0,0	1,90	6,40	250,73
0,5	1,83	6,20	
1,0	1,93	6,20	214,07
1,5	1,96	6,15	
2,0	1,93	6,10	180,08
2,5	1,90	6,05	
3,0	1,89	6,20	
3,5	1,88	6,40	122,84
4,0	1,78	6,50	107,64
4,5	1,75	6,70	
5,0			75,89

ANEXO 3

Ensaio cinéticos para avaliação da toxicidade crônica sobre a nitrificação

Cinética 17 10/01/12

Tempo (h)	mgO ₂ .gSSV ⁻¹ .min ⁻¹	mgO ₂ .L ⁻¹	ng N-NH ₃ .L ⁻¹
0,0	1,50	5,40	
0,5	1,58	5,20	
1,0	1,62	5,15	470,32
1,5	1,60	5,20	
2,0	1,58	5,20	430,08
2,5	1,64	5,25	
3,0	1,58	5,30	393,18
3,5	1,63	5,35	
4,0	1,57	5,40	351,82
5,0	1,60	5,45	311,57
5,5	1,72	5,45	
6,0	1,58		286,98

Cinética 18 19/01/12

Tempo (h)	mgO ₂ .gSSV ⁻¹ .min ⁻¹	mgO ₂ .L ⁻¹	ng N-NH ₃ .L ⁻¹
0,0	1,38	5,85	413,06
0,5	1,40	5,98	
1,0	1,53	5,66	394,28
1,5	1,56	5,55	
2,0	1,58	5,56	354,03
2,5	1,56	5,57	
3,0	1,63	5,56	325,41
3,5	1,62	5,43	
4,0	1,62	5,35	290,98
4,5	1,67	5,44	
5,0	1,67	5,42	268,17
5,5	1,64	5,24	
6,0			228,38

ANEXO 3

Ensaio cinéticos para avaliação da toxicidade crônica sobre a nitrificação

Cinética 19 20/01/12

Tempo (h)	mgO ₂ .gSSV ⁻¹ .min ⁻¹	mgO ₂ .L ⁻¹	ng N-NH ₃ .L ⁻¹
0,0	1,21	5,20	355,37
0,5	1,29	5,63	
1,0	1,34	5,33	314,23
1,5	1,43	5,11	
2,0	1,58	5,22	283,38
3,0	1,54	5,01	258,34
3,5	1,56	4,79	
4,0	1,67	4,72	210,04
4,5	1,69	4,80	
5,0	1,66	4,92	166,66
5,5	1,65	5,00	
6,0	1,53	5,14	129,55
6,5	1,47	5,25	113,90

Cinética 20 25/01/12

Tempo (h)	mgO ₂ .gSSV ⁻¹ .min ⁻¹	mgO ₂ .L ⁻¹	ng N-NH ₃ .L ⁻¹
0,0	1,05	6,20	400,99
0,5	1,10	6,42	
1,0	1,06	6,31	373,71
1,5	1,14	6,13	
2,0	1,19	6,12	358,95
2,5	1,19	6,15	
3,0	1,19	6,15	333,46
3,5	1,20	6,12	
4,0	1,31	6,05	310,66
4,5	1,35	5,77	
5,0	1,34	5,73	287,85

ANEXO 3

Ensaio cinéticos para avaliação da toxicidade crônica sobre a nitrificação

Cinética 21 02/02/12

Tempo (h)	$\text{mgO}_2.\text{gSSV}^{-1}.\text{min}^{-1}$	$\text{mgO}_2.\text{L}^{-1}$
0,0	1,06	4,12
0,5	1,10	4,30
1,0	1,15	4,71

Cinética 22 13/02/12

Tempo (h)	$\text{mgO}_2.\text{gSSV}^{-1}.\text{min}^{-1}$	$\text{mgO}_2.\text{L}^{-1}$
0,0	0,74	6,39
0,5	0,83	6,87
1,0	0,87	6,97
1,5	0,86	6,80
2,0	0,92	6,67

ANEXO 4**Monitoramento da biomassa do reator NTFtox**

Data da coleta	Dias de operação	SST (g.L⁻¹)	SSF (g.L⁻¹)	SSV (g.L⁻¹)
08/08/11	29	3,08	0,34	2,73
17/08/11	38	1,13	0,07	1,06
22/08/11	43	1,01	0,14	0,88
30/08/11	51	0,89	0,10	0,79
12/09/11	64	1,45	0,18	1,27
15/09/11	67	1,43	0,24	1,19
20/09/11	72	0,66	0,11	0,55
26/09/11	78	0,76	0,10	0,66
28/09/11	80	0,83	0,11	0,72
03/10/11	85	0,96	0,05	0,91
05/10/11	87	1,00	0,12	0,88
07/10/11	89	1,08	0,20	0,88
10/10/11	92	1,13	0,14	0,99
11/10/11	93	0,90	0,16	0,74
13/10/11	95	1,16	0,17	0,98
14/10/11	96	1,04	0,16	0,88
19/10/11	101	1,27	0,15	1,12
27/10/11	109	0,90	0,02	0,87
03/11/11	116	0,98	0,20	0,78
16/11/11	129	1,22	0,24	0,98
17/11/11	130	1,36	0,23	1,12
21/11/11	134	1,56	0,17	1,39
24/11/11	137	1,40	0,14	1,26
28/11/11	141	1,36	0,01	1,34
30/11/11	143	1,45	-0,03	1,48
05/12/11	148	1,80	0,06	1,74

ANEXO 4**Monitoramento da biomassa do reator NTFtox**

Data da coleta	Dias de operação	SST (g.L⁻¹)	SSF (g.L⁻¹)	SSV (g.L⁻¹)
13/12/11	156	1,86	0,16	1,70
19/12/11	162	1,74	0,25	1,49
20/12/11	163	1,92	0,27	1,65
28/12/11	171	1,70	0,25	1,46
02/01/12	176	1,14	0,15	1,00
05/01/12	179	1,07	0,07	0,99
10/01/12	184	1,31	0,15	1,16
16/01/12	190	1,35	0,24	1,11
19/01/12	193	1,42	0,10	1,31
20/01/12	194	1,55	0,03	1,53
23/01/12	197	1,68	0,20	1,48
24/01/12	198	1,75	0,11	1,64
25/01/12	199	1,45	0,02	1,43
02/02/12	207	1,69	0,07	1,62
08/02/12	213	1,90	0,01	1,89
13/02/12	218	1,79	0,20	1,59

ANEXO 5
Monitoramento reator NTF_{tox}

151

Dias de operação	Data da coleta	[Colistina] mg.L ⁻¹	log [colistina] mg.L ⁻¹	N-NAT efluente	N-NO ₂ ⁻ efluente	N-NO ₃ ⁻ efluente	Eficiência eliminação N-NAT (%)
2	12/07/2011	0	-	254,2	34,5	77,5	75%
3	13/07/2011	0	-	89,4	378,0	42,9	91%
4	14/07/2011	0	-	5,9	557,3	440,1	99%
16	26/07/2011	0	-	0,0	0,7	969,9	100%
17	27/07/2011	0	-	0,0	0,7	931,9	100%
18	28/07/2011	0	-	0,0	0,9	921,5	100%
22	01/08/2011	0	-	0,0	0,9	940,5	100%
25	04/08/2011	0	-	0,0	49,9	949,1	100%
26	05/08/2011	0	-	0,0	0,4	947,4	100%
31	10/08/2011	0	-	0,0	0,3	919,8	100%
39	18/08/2011	0	-	0,0	1,2	996,0	100%
43	22/08/2011	0	-	57,4	3,5		94%
44	23/08/2011	0	-	0,0	1,0	817,1	100%
50	29/08/2011	0	-	0,0	0,7	896,4	100%
51	30/08/2011	0	-	0,0			100%
58	06/09/2011	0	-	0,0	0,5	892,3	100%
59	07/09/2011	0	-	0,0	0,4	915,6	100%
64	12/09/2011	0	-	0,0			100%
66	14/09/2011	0	-	0,0	0,4	887,1	100%
67	15/09/2011	0,1	-1	0,0			100%
72	20/09/2011	0,18	-0,75	28,0			97%
73	21/09/2011	0,32	-0,5	34,5	1,1	845,6	97%
74	22/09/2011	0,32	-0,5	27,5	0,6	848,2	97%
78	26/09/2011	0,32	-0,5	127,0			87%
80	28/09/2011	0,32	-0,5	20,6	0,5	840,4	98%
85	03/10/2011	0,32	-0,5	486,6	0,2	464,6	51%

ANEXO 5

Monitoramento reator NTF_{tox}

Dias de operação	Data da coleta	[Colistina] mg.L ⁻¹	log [colistina] mg.L ⁻¹	N-NAT efluente	N-NO ₂ ⁻ efluente	N-NO ₃ ⁻ efluente	Eficiência eliminação N-NAT (%)
86	04/10/2011	0,32	-0,5	375,8	1,0	557,9	62%
87	05/10/2011	0,32	-0,5	84,7	3,6	731,6	92%
88	06/10/2011	0,32	-0,5	3,6	0,5	837,9	100%
92	10/10/2011	0,32	-0,5	0,0	0,6	869,0	100%
93	11/10/2011	0,32	-0,5	49,7	1,3	786,0	95%
95	13/10/2011	0,56	-0,25	0,0	0,3	883,2	100%
96	14/10/2011	0,56	-0,25	0,0	0,2	896,2	100%
99	17/10/2011	0,56	-0,25	16,5	0,4	918,2	98%
100	18/10/2011	0,56	-0,25	0,0	0,4	994,7	100%
102	20/10/2011	1	0	0,0	0,1	964,9	100%
103	21/10/2011	1	0	0,0	0,2	926,0	100%
106	24/10/2011	1	0	0,0	0,4	940,2	100%
108	26/10/2011	1	0	1,2	0,6	949,3	100%
114	01/11/2011	1	0	167,6	6,6	739,3	83%
116	03/11/2011	1	0	22,3	0,4	939,0	98%
117	04/11/2011	1	0	0,0	0,2	931,2	100%
122	09/11/2011	1,78	0,25	0,0	0,4	789,9	100%
129	16/11/2011	1,78	0,25	0,3	0,2	830,1	100%
131	18/11/2011	1,78	0,25	0,0	0,4	861,2	100%
134	21/11/2011	1,78	0,25	29,0	0,6	843,0	97%
137	24/11/2011	1,78	0,25	34,6	1,0	878,0	97%
140	27/11/2011	3,16	0,5	31,6	0,6	859,9	97%
142	29/11/2011	3,16	0,5	30,0	0,2	861,2	97%
143	30/11/2011	3,16	0,5	22,9	0,2	905,3	98%
144	01/12/2011	3,16	0,5	43,3	0,3	888,4	96%
145	02/12/2011	3,16	0,5	50,5	0,2	905,3	95%

ANEXO 5
Monitoramento reator NTF_{tox}

153

Dias de operação	Data da coleta	[Colistina] mg.L ⁻¹	log [colistina] mg.L ⁻¹	N-NAT efluente	N-NO ₂ ⁻ efluente	N-NO ₃ ⁻ efluente	Eficiência eliminação N-NAT (%)
146	03/12/2011	3,16	0,5	33,3	0,4	954,5	97%
147	04/12/2011	3,16	0,5	52,2	0,4	870,3	95%
148	05/12/2011	3,16	0,5	26,7	0,3	918,2	97%
149	06/12/2011	3,16	0,5	19,5			98%
150	07/12/2011	5,62	0,75	7,7	0,1	905,3	99%
151	08/12/2011	5,62	0,75	13,1	0,4	961,0	99%
155	12/12/2011	5,62	0,75	55,3	1,3	872,8	94%
156	13/12/2011	5,62	0,75	38,5	0,4	920,8	96%
157	14/12/2011	5,62	0,75	26,6	0,5	900,1	97%
158	15/12/2011	5,62	0,75	25,9	0,4	824,9	97%
159	16/12/2011	5,62	0,75	31,1	0,4	872,8	97%
160	17/12/2011	5,62	0,75	40,9	0,5	808,0	96%
162	19/12/2011	5,62	0,75	61,4	0,6	831,4	94%
163	20/12/2011	10	1	40,9	1,3	795,1	96%
164	21/12/2011	10	1	0,0	0,4	967,5	100%
165	22/12/2011	10	1	22,9	0,7	874,1	98%
169	26/12/2011	10	1	0,0	0,7	926,0	100%
170	27/12/2011	10	1	0,0	0,5	946,7	100%
172	29/12/2011	17,78	1,25	0,0	0,5	918,2	100%
173	30/12/2011	17,78	1,25	0,0	0,7	933,8	100%
175	01/01/2012	17,78	1,25	1,0	0,6	918,2	100%
176	02/01/2012	31,6	1,5	0,0	0,7	980,4	100%
178	04/01/2012	31,6	1,5	11,7	0,7	918,2	99%
179	05/01/2012	31,6	1,5	15,0			99%
180	06/01/2012	31,6	1,5	95,2	4,3	814,5	90%
182	08/01/2012	31,6	1,5	88,8	41,4	521,6	91%

ANEXO 5

Monitoramento reator NTF_{tox}

Dias de operação	Data da coleta	[Colistina] mg.L ⁻¹	log [colistina] mg.L ⁻¹	N-NAT efluente	N-NO ₂ ⁻ efluente	N-NO ₃ ⁻ efluente	Eficiência eliminação N-NAT (%)
183	09/01/2012	31,6	1,5	79,9	21,3	607,1	92%
184	10/01/2012	31,6	1,5	42,6	4,5	766,6	96%
186	12/01/2012	31,6	1,5	1,9	0,4	940,2	100%
190	16/01/2012	31,6	1,5	43,0	3,8	787,3	96%
199	25/01/2012	56,23	1,75	226,0	1,3	773,0	77%
200	26/01/2012	56,23	1,75	317,0	2,5	713,4	68%
205	31/01/2012	56,23	1,75	289,4	3,6	757,5	71%
206	01/02/2012	56,23	1,75	197,5	3,1	769,2	80%
207	02/02/2012	100	2	169,5	3,6	802,9	83%
210	05/02/2012	100	2	369,7	9,1	625,3	63%
212	07/02/2012	100	2	345,4	4,4	677,1	65%
214	09/02/2012	100	2	245,1	13,8	666,8	75%
215	10/02/2012	100	2	646,4	8,6	165,2	35%
218	13/02/2012	100	2	475,2	10,8	311,6	52%
219	14/02/2012	100	2	554,9			45%
220	15/02/2012	100	2	587,1	5,5	207,9	41%
221	16/02/2012	100	2	625,6	4,6	141,8	37%
222	17/02/2012	100	2	689,7	4,1	198,9	31%
223	18/02/2012	100	2	675,7	4,9	153,5	32%
224	19/02/2012	100	2	745,7	6,4	88,7	25%
225	20/02/2012	100	2	790,1	5,4	189,8	21%
227	22/02/2012	100	2	839,1	4,6	112,0	16%

ANEXO 6 Monitoramento reator UASB

Dia operação	Data	Colistina (mg.L ⁻¹)	L biogás/d	DQO afluente	DQO efluente	Vazão (L.d ⁻¹)	Carga volumétrica	Remoção	DQO esperada	Carga orgânica volumétrica esperada
1	08/07/2010	0	-	-	-	3,3	1100,00	-	2000	1100
9	16/07/2010	0	-	1840,88	873,49	3,3	1012,48	0,53	2000	1100
27	03/08/2010	0	-	1794,18	489,08	3,3	986,80	0,73	2000	1100
34	10/08/2010	0	-	1919,19	443,28	5,0	1599,32	0,77	2000	1667
47	23/08/2010	0	-	1906,69	335,35	5,0	1588,91	0,82	2000	1667
64	09/09/2010	0	-	1906,69	233,95	5,0	1588,91	0,88	2000	1667
75	20/09/2010	0	-	3056,73	459,64	5,0	2547,28	0,85	3000	2500
82	27/09/2010	0	-	2994,23	243,76	5,0	2495,19	0,92	3000	2500
99	14/10/2010	0	-	2819,22	90,03	5,0	2349,35	0,97	3000	2500
126	10/11/2010	0	-	2956,73	44,24	5,0	2463,94	0,99	3000	2500
138	22/11/2010	0	-	2769,22	67,13	5,0	2307,68	0,98	3000	2500
152	06/12/2010	0	-	2881,73	24,61	5,0	2401,44	0,99	3000	2500
187	10/01/2011	0	-	2894,23	30,16	5,0	2411,86	0,99	3000	2500
201	24/01/2011	0	-	3869,27	96,20	5,0	3224,39	0,98	4000	3333
210	02/02/2011	0	-	3931,77	395,81	5,0	3276,47	0,90	4000	3333

ANEXO 6

Monitoramento reator UASB

Dia operação	Data	Colistina (mg.L ⁻¹)	L biogás/d	DOO afluente	DOO efluente	Vazão (L.d ⁻¹)	Carga volumétrica	Remoção	DOO esperada	Carga orgânica volumétrica esperada
216	08/02/2011	0	-	4019,27	189,09	5,0	3349,39	0,95	4000	3333
219	11/02/2011	0	-	3969,27	179,93	5,0	3307,72	0,95	4000	3333
222	14/02/2011	0	-	3819,26	109,28	5,0	3182,72	0,97	4000	3333
224	16/02/2011	0	-	5081,81	84,42	5,0	4234,84	0,98	5400	4500
226	18/02/2011	0	-	5231,82	115,82	5,0	4359,85	0,98	5400	4500
237	01/03/2011	0	-	5219,32	802,71	5,0	4349,43	0,85	5400	4500
238	02/03/2011	0	7,07	5447,63	788,31	5,0	4539,69	0,86	5400	4500
239	03/03/2011	0	7,16	5222,62	639,85	5,0	4352,19	0,88	5400	4500
240	04/03/2011	0	7,56	5185,12	642,46	5,0	4320,94	0,88	5400	4500
241	05/03/2011	0	7,07	5447,63	587,51	5,0	4539,69	0,89	5400	4500
244	08/03/2011	0	0,00	5372,63	511,63	5,0	4477,19	0,90	5400	4500
251	15/03/2011	0	0,00	5110,12	535,18	5,0	4258,43	0,90	5400	4500
258	22/03/2011	0	0,00	5447,63	438,36	5,0	4539,69	0,92	5400	4500
264	28/03/2011	0	7,78	4885,11	354,63	5,0	4070,93	0,93	5400	4500
265	29/03/2011	0	6,89	5728,89	632,00	5,0	4774,08	0,89	5400	4500

ANEXO 6

Monitoramento reator UASB

Dia operação	Data	Colistina (mg.L ⁻¹)	L biogás/d	DOO afluente	DOO efluente	Vazão (L.d ⁻¹)	Carga volumétrica	Remoção	DOO esperada	Carga orgânica volumétrica esperada
267	31/03/2011	0	7,85	5316,38	226,13	5,0	4430,32	0,96	5400	4500
268	01/04/2011	0	7,81	4697,60	217,46	5,0	3914,67	0,95	5400	4500
270	03/04/2011	0	0,00	5091,37	67,08	5,0	4242,81	0,99	5400	4500
271	04/04/2011	0	0,00	4960,11	379,03	5,0	4133,43	0,92	5400	4500
272	05/04/2011	0	6,33	5203,87	390,21	5,0	4336,56	0,93	5400	4500
273	06/04/2011	0	7,85	4753,86	278,36	5,0	3961,55	0,94	5400	4500
274	07/04/2011	0	0,00	5128,87	173,96	5,0	4274,06	0,97	5400	4500
275	08/04/2011	0,1	8,50	4997,62	118,04	5,0	4164,68	0,98	5400	4500
276	09/04/2011	0,1	8,13	5072,62	132,95	5,0	4227,18	0,97	5400	4500
279	12/04/2011	0,1	7,61	4678,85	160,29	5,0	3899,04	0,97	5400	4500
280	13/04/2011	0,1	7,62	4772,61	147,86	5,0	3977,17	0,97	5400	4500
281	14/04/2011	0,1	0,00	5016,37	328,07	5,0	4180,31	0,93	5400	4500
282	15/04/2011	0,1	7,37	5260,13	352,93	5,0	4383,44	0,93	5400	4500
283	16/04/2011	0,1	8,10	5128,87	309,43	5,0	4274,06	0,94	5400	4500
284	17/04/2011	0,32	8,27	5447,63	591,54	5,0	4539,69	0,89	5400	4500

ANEXO 6

Monitoramento reator UASB

Dia operação	Data	Colistina (mg.L ⁻¹)	L biogás/d	DQO afluente	DQO efluente	Vazão (L.d ⁻¹)	Carga volumétrica	Remoção	DQO esperada	Carga orgânica volumétrica esperada
285	18/04/2011	0,32	0,00	5278,88	434,95	5,0	4399,06	0,92	5400	4500
286	19/04/2011	0,32	9,03	5072,62	231,13	5,0	4227,18	0,95	5400	4500
288	21/04/2011	0,32	8,84	5091,37	137,92	5,0	4242,81	0,97	5400	4500
289	22/04/2011	0,32	9,07	5035,12	114,31	5,0	4195,93	0,98	5400	4500
290	23/04/2011	0,32	7,78	4903,86	274,63	5,0	4086,55	0,94	5400	4500
292	25/04/2011	0,32	7,65	5185,12	267,17	5,0	4320,94	0,95	5400	4500
293	26/04/2011	0,32	8,02	5110,12	347,96	5,0	4258,43	0,93	5400	4500
294	27/04/2011	0,56	8,94	5110,12	37,23	5,0	4258,43	0,99	5400	4500
299	02/05/2011	0,56	8,66	5522,64	270,90	5,0	4602,20	0,95	5400	4500
300	03/05/2011	0,56	7,81	5241,38	513,25	5,0	4367,81	0,90	5400	4500
301	04/05/2011	0,56	0,00	5131,82	469,72	5,0	4276,51	0,91	5400	4500
302	05/05/2011	0,56	7,30	5294,32	693,45	5,0	4411,94	0,87	5400	4500
303	06/05/2011	1	7,39	5394,33	253,50	5,0	4495,27	0,95	5400	4500
306	09/05/2011	1	0,00	5281,82	257,23	5,0	4401,52	0,95	5400	4500
307	10/05/2011	1	8,61	5431,83	423,77	5,0	4526,52	0,92	5400	4500

ANEXO 6

Monitoramento reator UASB

Dia operação	Data	Colistina (mg.L ⁻¹)	L biogás/d	DQO afluente	DQO efluente	Vazão (L.d ⁻¹)	Carga volumétrica	Remoção	DQO esperada	Carga orgânica volumétrica esperada
308	11/05/2011	1	8,94	5419,33	313,16	5,0	4516,11	0,94	5400	4500
309	12/05/2011	1	7,62	5219,32	561,72	5,0	4349,43	0,89	5400	4500
310	13/05/2011	1	8,31	5456,83	434,95	5,0	4547,36	0,92	5400	4500
312	15/05/2011	1	8,29	5381,83	620,13	5,0	4484,85	0,88	5400	4500
313	16/05/2011	1,78	7,64	5356,82	765,54	5,0	4464,02	0,86	5400	4500
314	17/05/2011	1,78	7,35	5594,33	754,35	5,0	4661,95	0,87	5400	4500
315	18/05/2011	1,78	7,26	5469,33	736,95	5,0	4557,77	0,87	5400	4500
316	19/05/2011	1,78	7,62	5419,33	640,01	5,0	4516,11	0,88	5400	4500
317	20/05/2011	1,78	8,82	5281,82	582,84	5,0	4401,52	0,89	5400	4500
318	21/05/2011	1,78	8,27	-	-	-	-	-	-	-
320	23/05/2011	1,78	8,06	-	-	-	-	-	-	-
324	27/05/2011	1,78	0,00	5269,32	606,46	5,0	4391,10	0,88	5400	4500
325	28/05/2011	1,78	0,00	5144,32	996,70	5,0	4286,93	0,81	5400	4500
326	29/05/2011	1,78	6,47	-	-	-	-	-	5400	4500
327	30/05/2011	1,78	7,88	5444,33	554,23	5,0	4536,94	0,90	5400	4500

ANEXO 6

Monitoramento reator UASB

Dia operação	Data	Colistina (mg.L ⁻¹)	L biogás/d	DOO afluente	DOO efluente	Vazão (L.d ⁻¹)	Carga volumétrica	Remoção	DOO esperada	Carga orgânica volumétrica esperada
328	31/05/2011	1,78	0,00	5344,32	627,59	5,0	4453,60	0,88	5400	4500
331	03/06/2011	1,78	6,98	5194,32	484,66	5,0	4328,60	0,91	5400	4500
332	04/06/2011	1,78	6,35	4856,80	784,18	5,0	4047,34	0,84	5400	4500
333	05/06/2011	1,78	5,67	-	-	-	-	-	-	-
334	06/06/2011	1,78	6,22	5156,82	1073,72	5,0	4297,35	0,79	5400	4500
335	07/06/2011	1,78	7,85	5194,32	464,75	5,0	4328,60	0,91	5400	4500
336	08/06/2011	1,78	7,99	4831,80	246,05	5,0	4026,50	0,95	5400	4500
337	09/06/2011	1,78	8,04	5194,32	457,32	5,0	4328,60	0,91	5400	4500
338	10/06/2011	1,78	7,83	5069,31	397,67	5,0	4224,43	0,92	5400	4500
340	12/06/2011	1,78	8,11	-	-	-	-	-	-	-
342	14/06/2011	1,78	7,79	4856,80	228,65	5,0	4047,34	0,95	5400	4500
343	15/06/2011	1,78	6,89	4831,80	210,00	5,0	4026,50	0,96	5400	4500
344	16/06/2011	3,16	8,41	4844,30	342,98	5,0	4036,92	0,93	5400	4500
345	17/06/2011	3,16	8,29	4944,31	191,36	5,0	4120,26	0,96	5400	4500
348	20/06/2011	3,16	6,89	5094,31	144,14	5,0	4245,26	0,97	5400	4500

ANEXO 6

Monitoramento reator UASB

Dia operação	Data	Colistina (mg.L ⁻¹)	L biogás/d	DOO afluente	DOO efluente	Vazão (L.d ⁻¹)	Carga volumétrica	Remoção	DOO esperada	Carga orgânica volumétrica esperada
349	21/06/2011	3,16	7,65	5056,81	282,09	5,0	4214,01	0,94	5400	4500
350	22/06/2011	3,16	7,88	5131,82	264,69	5,0	4276,51	0,95	5400	4500
351	23/06/2011	3,16	8,68	4969,31	309,43	5,0	4141,09	0,94	5400	4500
352	24/06/2011	3,16	6,58	5244,32	305,70	5,0	4370,27	0,94	5400	4500
353	25/06/2011	3,16	7,35	5069,31	210,00	5,0	4224,43	0,96	5400	4500
355	27/06/2011	3,16	6,68	5031,81	466,02	5,0	4193,18	0,91	5400	4500
356	28/06/2011	3,16	5,60	5019,31	438,68	5,0	4182,76	0,91	5400	4500
358	30/06/2011	3,16	6,47	5056,81	205,03	5,0	4214,01	0,96	5400	4500
364	06/07/2011	3,16	7,71	5056,81	390,21	5,0	4214,01	0,92	5400	4500
365	07/07/2011	3,16	7,97	5231,82	289,54	5,0	4359,85	0,94	5400	4500
366	08/07/2011	3,16	6,13	5106,81	287,06	5,0	4255,68	0,94	5400	4500
370	12/07/2011	3,16	6,29	5269,32	525,68	5,0	4391,10	0,90	5400	4500
371	13/07/2011	3,16	6,49	5044,31	285,82	5,0	4203,59	0,94	5400	4500
372	14/07/2011	5,62	6,89	5056,81	379,03	5,0	4214,01	0,93	5400	4500
373	15/07/2011	5,62	6,66	5106,81	314,40	5,0	4255,68	0,94	5400	4500

ANEXO 6 Monitoramento reator UASB

Dia operação	Data	Colistina (mg.L ⁻¹)	L biogás/d	DQO afluente	DQO efluente	Vazão (L.d ⁻¹)	Carga volumétrica	Remoção	DQO esperada	Carga orgânica volumétrica esperada
374	16/07/2011	5,62	7,02	5006,81	283,33	5,0	4172,34	0,94	5400	4500
375	17/07/2011	5,62	6,49	5381,83	159,05	5,0	4484,85	0,97	5400	4500
376	18/07/2011	5,62	6,36	5281,82	197,58	5,0	4401,52	0,96	5400	4500
377	19/07/2011	5,62	7,88	5156,82	258,47	5,0	4297,35	0,95	5400	4500
379	21/07/2011	5,62	0,00	5094,31	190,12	5,0	4245,26	0,96	5400	4500
380	22/07/2011	5,62	0,00	5256,82	571,66	5,0	4380,68	0,89	5400	4500
381	23/07/2011	5,62	0,00	5056,81	406,37	5,0	4214,01	0,92	5400	4500
382	24/07/2011	5,62	0,00	5144,32	355,41	5,0	4286,93	0,93	5400	4500
383	25/07/2011	5,62	0,00	5081,81	354,17	5,0	4234,84	0,93	5400	4500
384	26/07/2011	5,62	0,00	5081,81	354,17	5,0	4234,84	0,93	5400	4500
385	27/07/2011	5,62	7,62	4919,31	299,49	5,0	4099,42	0,94	5400	4500
386	28/07/2011	5,62	0,00	5169,32	236,10	5,0	4307,76	0,95	5400	4500
387	29/07/2011	5,62	7,49	5081,81	260,96	5,0	4234,84	0,95	5400	4500
389	31/07/2011	5,62	7,09	5406,83	141,65	5,0	4505,69	0,97	5400	4500
390	01/08/2011	10	0,00	5119,32	528,16	5,0	4266,10	0,90	5400	4500

ANEXO 6 Monitoramento reator UASB

Dia operação	Data	Colistina (mg.L ⁻¹)	L biogás/d	DOO afluente	DOO efluente	Vazão (L.d ⁻¹)	Carga volumétrica	Remoção	DOO esperada	Carga orgânica volumétrica esperada
391	02/08/2011	10	6,68	5106,81	374,05	5,0	4255,68	0,93	5400	4500
392	03/08/2011	10	6,38	5081,81	498,33	5,0	4234,84	0,90	5400	4500
393	04/08/2011	10	6,45	5081,81	504,55	5,0	4234,84	0,90	5400	4500
394	05/08/2011	10	6,38	5119,32	548,05	5,0	4266,10	0,89	5400	4500
397	08/08/2011	10	6,26	4994,31	347,96	5,0	4161,93	0,93	5400	4500
398	09/08/2011	10	6,38	5344,32	301,97	5,0	4453,60	0,94	5400	4500
399	10/08/2011	10	6,70	5194,32	364,11	5,0	4328,60	0,93	5400	4500
400	11/08/2011	10	7,00	5144,32	299,49	5,0	4286,93	0,94	5400	4500
401	12/08/2011	10	7,62	-	-	-	-	-	-	-
403	14/08/2011	10	7,28	-	-	-	-	-	-	-
404	15/08/2011	17,78	7,58	5081,81	377,78	5,0	4234,84	0,93	5400	4500
405	16/08/2011	17,78	8,20	-	-	-	-	-	-	-
406	17/08/2011	17,78	7,67	5106,81	359,14	5,0	4255,68	0,93	5400	4500
412	23/08/2011	17,78	0,00	5081,81	840,07	5,0	4234,84	0,83	5400	4500
413	24/08/2011	17,78	7,97	5144,32	298,21	5,0	4286,93	0,94	5400	4500

ANEXO 6

Monitoramento reator UASB

Dia operação	Data	Colistina (mg.L ⁻¹)	L biogás/d	DOO afluente	DOO efluente	Vazão (L.d ⁻¹)	Carga volumétrica	Remoção	DOO esperada	Carga orgânica volumétrica esperada
415	26/08/2011	17,78	6,82	5306,82	534,35	5,0	4422,35	0,90	5400	4500
416	27/08/2011	31,62	6,59	-	-	-	-	-	-	-
418	29/08/2011	31,62	5,32	5119,32	475,96	5,0	4266,10	0,91	5400	4500
419	30/08/2011	31,62	7,18	5344,32	411,34	5,0	4453,60	0,92	5400	4500
420	31/08/2011	31,62	5,97	5119,32	521,95	5,0	4266,10	0,90	5400	4500
421	01/09/2011	31,62	6,06	5319,32	697,18	5,0	4432,77	0,87	5400	4500
422	02/09/2011	31,62	5,82	5344,32	956,93	5,0	4453,60	0,82	5400	4500
423	03/09/2011	31,62	6,38	-	-	-	-	-	-	-
424	04/09/2011	31,62	5,74	-	-	-	-	-	-	-
425	05/09/2011	31,62	5,48	5456,83	543,07	5,0	4547,36	0,90	5400	4500
426	06/09/2011	56,24	6,47	5094,31	390,18	5,0	4245,26	0,92	5400	4500
427	07/09/2011	56,24	0,00	5194,32	610,19	5,0	4328,60	0,88	5400	4500
428	08/09/2011	56,24	7,71	5269,32	487,12	5,0	4391,10	0,91	5400	4500
429	09/09/2011	56,24	6,47	5219,32	457,29	5,0	4349,43	0,91	5400	4500
430	10/09/2011	56,24	7,09	-	-	-	-	-	-	-

ANEXO 6

Monitoramento reator UASB

Dia operação	Data	Colistina (mg.L ⁻¹)	L biogás/d	DQO afluente	DQO efluente	Vazão (L.d ⁻¹)	Carga volumétrica	Remoção	DQO esperada	Carga orgânica esperada
431	11/09/2011	56,24	6,50	-	-	-	-	-	-	-
432	12/09/2011	100	5,41	5394,33	703,37	5,0	4495,27	0,87	5400	4500
433	13/09/2011	100	6,03	5394,33	681,00	5,0	4495,27	0,87	5400	4500
434	14/09/2011	100	6,38	5119,32	797,82	5,0	4266,10	0,84	5400	4500
435	15/09/2011	100	5,87	5381,83	569,14	5,0	4484,85	0,89	5400	4500
436	16/09/2011	100	5,89	5419,33	564,17	5,0	4516,11	0,90	5400	4500
437	17/09/2011	100	7,49	-	-	-	-	-	-	-
438	18/09/2011	100	7,35	-	-	-	-	-	-	-
439	19/09/2011	100	7,78	5406,83	825,16	5,0	4505,69	0,85	5400	4500
440	20/09/2011	100	7,18	5081,81	777,93	5,0	4234,84	0,85	5400	4500
442	22/09/2011	100	0,00	4981,81	782,91	5,0	4151,51	0,84	5400	4500
443	23/09/2011	100	7,11	5219,32	753,08	5,0	4349,43	0,86	5400	4500
444	24/09/2011	100	6,52	-	-	-	-	-	-	-
445	25/09/2011	100	6,86	-	-	-	-	-	-	-
446	26/09/2011	100	-	4819,30	623,83	5,0	4016,09	0,87	5400	4500

ANEXO 7

Protocolos para FISH

167

SOLUÇÕES USADAS PARA FIXAÇÃO DE AMOSTRAS E FISH

Solução fixadora - paraformaldeído 4% (PARA 20 mL):

* Deve ser preparado no dia do uso.

- Aquecer em banho-maria 60 °C 13,33 mL de água destilada;
- Adicionar 0,8 g de Paraformaldeído;
- Adicionar algumas gotas de NaOH 10 N;
- Deixar no banho-maria até dissolver o paraformaldeído;
- Adicionar 6,66 mL de PBS 3x.

TE (para 100 mL)

- | | |
|---|--------|
| a. Tris HCl 1 M pH 7.5 (pode ser pH de 7.4 a 8.0) | 1 mL |
| b. EDTA 0,5 M pH 8.0 | 200 µL |
| c. Água ultrapura | 98 mL |

Não há necessidade de autoclavar a solução, pois todos os reagentes utilizados estão estéreis.

Tris HCl 1 M pH 8,0 (para 100 mL)

- O ajuste de pH deve ser realizado em capela de exaustão.
- Tris 12,11 g
- Água ultrapura 100 mL

Modo de preparo:

- Pesar o Tris;
- Transferir para um becker;
- Adicionar 75 mL de água ultrapura;

ANEXO 7

Protocolos para FISH

- IV. Dissolver o Tris por agitação com barra magnética;
- V. Ajustar o pH com HCl concentrado (fazer isso na capela de exaustão);
- VI. Completar para 100 mL com água ultrapura;
- VII. Esterilizar por autoclavação a 121 °C por 15 minutos;
- VIII. Armazenar a temperatura ambiente.

SDS 10% (para 100 mL)

- | | |
|-----------------------------------|-------|
| a. Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) | 10 g |
| b. Água ultrapura | 90 mL |

Modo de preparo:

- I. Pesar o SDS;
- II. Colocar em um becker;
- III. Adicionar 90 mL de água ultrapura;
- IV. Aquecer em banho-maria a 56 °C por alguns minutos;
- V. Misturar a solução usando barra magnética e aquecimento até que o SDS dissolva completamente;
- VI. Esterilizar por autoclavação a 121 °C por 15 minutos;
- VII. Armazenar em temperatura ambiente.

NaCl 5 M

- | | |
|-------------------|---------|
| a. NaCl | 29,22 g |
| b. Água ultrapura | 100 mL |

Modo de preparo:

- I. Pesar o NaCl;
- II. Adicionar 75 mL de água ultrapura;
- III. Agitar com barra magnética até dissolver completamente o NaCl (aquecer em banho-maria se necessário);
- IV. Completar para 100 mL;
- V. Autoclavar a 121 °C por 15 minutos;
- VI. Armazenar em temperatura ambiente.

EDTA 0,5M pH 8.0 (para 400mL)

Manipular NaOH (soda caustica) com cuidado e EPIs adequados.

Reagente corrosivo.

- | | |
|-------------------|---------|
| a. EDTA | 18,61 g |
| b. Água ultrapura | 100 mL |

Modo de preparo:

- I. Pesar o EDTA;
- II. Transferir para um becker de capacidade para 200mL;
- III. Adicionar 50 mL de água ultrapura;
- IV. Manter sob agitação com barra magnética;
- V. O EDTA não dissolve até que a solução atinja pH 8.0. Desta forma, adicionar **CUIDADOSAMENTE** NaOH 10 N até que a solução atinja pH 8.0 (manter sempre a agitação).
- VI. Após atingir pH 8.0, transferir a solução para uma proveta graduada de 100 mL.
- VII. Completar para 100 mL com água ultrapura.
- VIII. Esterilizar por autoclavação a 121 °C por 15 minutos;
- IX. Armazenar em temperatura ambiente.

ANEXO 7

Protocolos para FISH

Buffer de hibridização – PARA 1 mL:

Concentração formamida (%)	Tris HCl 1M pH 8,0 (μL)	SDS 10% (μL)	NaCl 5 M (μL)	Formamida (μL)	Água MilliQ (μL)
0	20	1	180	0	800
5	20	1	180	50	750
10	20	1	180	100	700
15	20	1	180	150	650
20	20	1	180	200	600
25	20	1	180	250	550
30	20	1	180	300	500
35	20	1	180	350	450
40	20	1	180	400	400
45	20	1	180	450	350
50	20	1	180	500	300
55	20	1	180	550	250

Solução de lavagem – PARA 1 mL:

Concentração formamida (%)	Tris HCl 1M pH 8,0 (μL)	EDTA 0,5M pH 8,0 (μL)	SDS 10% (μL)	NaCl 5M (μL)	Água MilliQ (μL)
0	20	10	1	900	69
5	20	10	1	630	339
10	20	10	1	450	519
15	20	10	1	310	659
20	20	10	1	215	754
25	20	10	1	149	820
30	20	10	1	102	867
35	20	10	1	70	899
40	20	10	1	46	923
45	20	10	1	30	939
50	20	10	1	18	951
55	20	10	1	10	959

PROTOCOLO PARA FIXAÇÃO EM PARAFORMALDEÍDO 3%

Soluções necessárias

PBS 1x

Volume / amostra 100 μ L: 3 mL

Desconsiderando o volume necessário para solução paraformaldeído.

Paraformaldeído 4% (preparado no dia do uso)

Volume / amostra 100 μ L: 1 mL

Protocolo

1. Centrifugar 100 μ L da amostra a 4500 rpm por 10 min;
2. Descartar o sobrenadante;
3. Ressuspender a biomassa em 1 mL de PBS 1x;
4. Centrifugar a 4500 rpm por 10 min;
5. Descartar o sobrenadante;
6. Adicionar 330 μ L de PBS 1x;
7. Adicionar 1 mL de paraformaldeído 4% (concentração final 3%);
8. Incubar por 4 horas (ou no máximo 18 horas) a 4°C;
9. Centrifugar a 4500 rpm por 10 min;
10. Descartar o sobrenadante;
11. Adicionar 1 mL de PBS 1x e agitar no vortex;
12. Centrifugar a 4500 rpm por 10 min;
13. Descartar o sobrenadante;
14. Ressuspender em 500 μ L de PBS 1x;
15. Adicionar 500 μ L de etanol 100%;
16. Conservar a -20 °C.

ANEXO 7

Protocolos para FISH

PREPARAÇÃO DE LÂMINAS PARA FISH (gelatina a 1%)

1. Estabilizar o banho-maria a 60 °C;
2. Organizar pipetas de vidro de maneira a formar suportes onde as lâminas serão colocadas para secarem (prender as pipetas na bancada com fita);
3. Em um becker de capacidade para 200 mL colocar:
 - a. 0,12 g de gelatina;
 - b. 120 mL de água destilada;
 - c. 0,012 g de $\text{CrK}(\text{SO}_4)_2$;
4. Deixar dissolver no banho-maria 60 °C;
5. Mergulhar as lâminas por 1 minuto na gelatina derretida.
6. Cuidar para que não se formem bolhas;
7. Deixar as lâminas escorrer por alguns segundos e coloca-las sobre o suporte para secarem;
8. Armazenar em caixa apropriada e a 4 °C.

PROTOCOLO PARA FISH

1. Retirar as lâminas da geladeira. Ligar estufa a 46 °C;
2. Colocar em cada poço de 2 a 10 µL da amostra já fixada; uma lâmina para cada amostra e um poço para cada sonda.
3. Colocar as lâminas dentro de um pote revestido de papel alumínio, com papel molhado no fundo para manter a umidade, e um suporte de alumínio para que as lâminas não entrem em contato com o papel úmido.
4. Levar as lâminas contendo as amostras até a estufa a 46 °C, onde permanecerão de 13 a 18 minutos;
5. Verificar se há sonda diluída suficiente para as análises; se não tiver sonda diluir:
 - a. As sondas devem ser diluídas 1:10 (1 µL de sonda – estoque está a 500 ng / µL – para 9 µL de TE).
 - b. Retirar do *Freezer* as sondas e os tampões que serão utilizados;
6. Retirar as lâminas da estufa e desidratar em série etanólica crescente (para desidratar e facilitar a entrada da sonda).
 - a. Álcool 50%, 3 minutos (diluir álcool comercial);
 - b. Álcool 80%, 3 minutos (diluir álcool comercial);
 - c. Álcool 100%, 3 minutos (usar etanol absoluto).
7. Retirar as lâminas e deixá-las inclinadas para escorrer (secar à temperatura ambiente);
8. Colocar 8µL do buffer de hibridização em cada poço.
CADA SONDA TEM SEU *BUFFER* NA CONCENTRAÇÃO ESPECÍFICA.

ANEXO 7

Protocolos para FISH

Sonda	Especificidade	[] do buffer de hibridização (%)
EUB mix (EUB338 I + EUB338 II + EUB338 III)	Eubactérias	20
Nso190	Todas bactérias oxidadoras de amônia	55
NIT3	<i>Nitrobacter</i> sp (bactérias oxidadoras de nitrato)	40
Amx820	<i>Candidatus Brocadia anammoxidans</i> <i>Candidatus Kuenenia stuttgartiensis</i>	40

8. (NO ESCURO) Pingar 2µL da sonda específica no seu respectivo poço (misturar gentilmente com a ponteira).
9. Colocar as lâminas na caixa protegida da luz com papel alumínio;
10. Verificar se o papel está úmido (se não estiver, colocar um pouco de água destilada).
11. Levar as amostras para a estufa a 46°C por 2 horas (quando completar 1 hora, verificar se o papel ainda está úmido).

Obs.: Cerca de 15 min antes do final do período de incubação, retirar o DAPI (o microtubo contendo o DAPI deve estar envolto em papel alumínio para proteger da luz) e as soluções de lavagem do *freezer*.
12. **Lavar as lâminas com água destilada (inclinar a lâmina para tirar os excessos, e depois lavar com água).**
13. Colocar 2µL de DAPI em cada poço (TROCAR SEMPRE A PONTEIRA);
14. Levar para a estufa por 20 minutos a 46°C;
15. Colocar a água destilada na geladeira para resfriar;
16. Inclinar a lâmina para tirar o excesso, lavar com água destilada;

ANEXO 7

Protocolos para FISH

175

17. Colocar 10µL da solução de lavagem em cada poço. Cada sonda precisa de uma concentração diferente de solução de lavagem:

Sonda	Especificidade	[] da solução de lavagem (%)
EUB mix (EUB338 I + EUB338 II + EUB338 III)	Eubactérias	20
Nso190	Todas bactérias oxidadoras de amônia	55
NIT3	<i>Nitrobacter</i> sp (bactérias oxidadoras de nitrito)	40
Amx820	<i>Candidatus Brocadia anammoxidans</i> <i>Candidatus Kuenenia stuttgartiensis</i>	40

18. Levar à estufa 48°C, por 20 minutos;
19. Retirar da estufa e passar água destilada gelada (4°C). Deixar escorrer;
20. Colocar uma gota de Citifluor 30% em glicerol sobre a lâmina;
21. Colocar as lamínulas (cuidar para não formar bolhas);
22. Guardar na caixa especial no *freezer*.